

**Mikrobielle Derivatisierung von Bismut  
im Maus-Modell und *in vitro*-Analysen  
der Biogenese von Trimethylbismut**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung  
des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie und Geografie  
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

***BRITTA HUBER***

aus Bochum

August 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie I der Universität Duisburg-Essen, Campus Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Hensel

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Bayer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Daniel Hering

Tag der mündlichen Prüfung: 4. November 2010

*In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern  
Bärbel und Peter Huber.*

Es gibt nichts Gutes, außer man tut es.

(Erich Kästner)

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>9</b>
2.1	Material .....	9
2.1.1	Herkunft von Chemikalien.....	9
2.1.2	Geräte .....	12
2.1.3	Organismen.....	14
2.1.4	Plasmide.....	15
2.2	Methoden .....	15
2.2.1	Anzucht von Mikroorganismen.....	15
2.2.1.1	Anzucht von <i>Methanosarcina mazei</i> Gö 1 .....	15
2.2.1.1.1	Ernte und Lagerung von <i>Methanosarcina mazei</i> Gö 1 .....	16
2.2.1.2	Anzucht von <i>E. coli</i> DH5α bzw. <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) .....	16
2.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	17
2.2.2.1	Isolierung genomischer DNS aus <i>M. mazei</i> .....	17
2.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNS (pET15b) aus <i>E. coli</i> DH5α .....	17
2.2.2.3	Quantitative und qualitative Analyse von DNS .....	17
2.2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese von DNS .....	18
2.2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	18
2.2.2.6	Reinigung von DNS-Fragmenten .....	21
2.2.2.7	Restriktion.....	21
2.2.2.8	Ligation.....	21
2.2.2.9	Herstellung kompetenter Zellen .....	22
2.2.2.10	Transformation von <i>E. coli</i> .....	22
2.2.2.11	Sequenzierung von DNS.....	22
2.2.3	Biochemische Methoden .....	23
2.2.3.1	Anreicherung von Proteinfractionen des zellfreien Extraktes von <i>M. mazei</i> mit Bismut-spezifischer Methylierungsaktivität.....	23
2.2.3.2	Reinigung des heterolog exprimierten Proteins MtbA mit und ohne His-tag.....	26
2.2.3.3	Proteinbestimmung .....	28
2.2.3.4	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach (Laemmli 1970) .....	29
2.2.3.5	Lagerung des gereinigten rekombinanten Proteins .....	30
2.2.4	Analytische Methoden .....	30
2.2.4.1	ICP-MS Analytik.....	30
2.2.4.2	Gasphasen-Analysen mittels ICP-MS .....	34
2.2.4.3	Gesamtmetallbestimmung .....	36

2.2.4.4	<i>In vitro</i> -Bismut-Methylierungs-Assays .....	36
2.2.4.4.1	Herstellung der Substrate und Lösungen .....	36
2.2.4.4.2	Bestimmung der Bismut-Methylierungsaktivität von Rohextrakten von <i>M. mazei</i> und der rekombinanten MtbA mit und ohne His-tag mittels des <i>in vitro</i> -Assays).....	38
2.2.4.5	Qualitativer Nachweis teilmethylierter Bismutspezies mittels Ethylierung und Detektion mittels PT-GC/ICP-MS-Analyse .....	39
2.2.4.6	Methyltransferase-Aktivitätsbestimmung der rekombinanten MtbA mittels UV/VIS-Spektrometrie .....	40
2.2.4.7	Homogenisieren und Trocknen der Mäuseorgane und der Blutproben..	41
2.2.4.8	Mikrowellendruckaufschluss .....	41
2.2.4.9	Quantifizierung von Trimethylbismut im Blut von konventionellen und keimfreien Mäusen .....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
3.1	Einfluss der Darmmikrobiota auf die Metabolisierung und Verteilung von oral aufgenommenem colloidalen Bismutsubcitrat (CBS) .....	44
3.1.1	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Gehalt im Blut der KONV-Gruppe und der KF-Gruppe .....	44
3.1.2	Bestimmung des Gesamtbismutgehaltes in Leber, Lunge, Niere, Hoden und Hirn der KONV-, KF- und KONV-Kontroll-Gruppe .....	46
3.1.3	Korrelation des (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Gehaltes im Blut mit dem Bismutgehalt in den Organen .....	48
3.2	Gegenüberstellung von abiotischer und biotischer Bismut-Methylierung in Gegenwart von Methylcobalamin.....	53
3.2.1	Abiotische (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Bildung unter Lichteinfluss .....	53
3.2.2	Abiotische (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Bildung in Gegenwart von Titan(III)Citrat (TiCit) .....	54
3.2.3	Abiotische (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Bildung durch Cob(I) .....	56
3.2.4	Gegenüberstellung von biotischer und abiotischer (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Produktion: Die zentrale Bedeutung von CoM .....	58
3.3	Anreicherung der Bismut-methylierenden Proteinfraction aus Rohextrakt von <i>M. mazei</i> .....	61
3.4	Heterologe Expression und Reinigung der MtbA (orf 1439) aus <i>M. mazei</i> .....	67
3.4.1	Heterologe Expression und Anreicherung der MtbA orf 1439 mit C-terminalem His-tag aus <i>M. mazei</i> in <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) .....	67
3.4.2	Heterologe Expression und Anreicherung der MtbA orf 1439 ohne C-terminalen His-tag aus <i>M. mazei</i> in <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) .....	69
3.4.3	Aktivitätsvergleich der rek. MtbA mit und ohne C-terminalem His-tag .....	73

3.5	Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Lagerungsbedingungen der MtbA auf die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion .....	74
3.5.1	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion in Abhängigkeit von der MtbA-Konzentration und der spezifischen Aktivität der Enzym-Präparation .....	77
3.6	Identifizierung der Intermediate und Produkte der enzymatischen CoM-Methylierung ohne und mit Bi-Ammoniumcitrat (über: UV/VIS-spektrofotometrische Bestimmungen) .....	81
3.6.1	Nachweis teilmethylierter Bismutderivate im biotischen und abiotischen <i>in vitro</i> -Assay durch Ethylierung mit Natriumtetraethylborat .....	88
3.7	Beeinflussende Faktoren der enzymatischen Bismut-Methylierung: Abhängigkeit von der Konzentration der Reaktanten .....	90
3.7.1	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion in Abhängigkeit von der MeCob-Konzentration .....	91
3.7.2	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion in Abhängigkeit von der CoM-Konzentration .....	92
3.7.3	Zeitverlauf und maximale Umsatzraten der biotischen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion in Abhängigkeit von Komponenten mit unterschiedlichem Redoxpotenzial ...	95
3.7.3.1	Einfluss der Vorinkubation der rek. MtbA mit CoM, GSH und DTT auf die enzymatische $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion .....	96
3.7.3.2	Einfluss der nicht-thiolhaltigen Reduktionsmittel TCEP und TiCit auf die biotische $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion: Effekt der Komponenten nach Vorinkubation der rekombinanten MtbA und nach direkter Zugabe beim Reaktionsstart .....	99
3.7.3.3	Einfluss von Oxidationsmitteln auf $V_{\text{maxTest}}$ und Lag-Phase der enzymatischen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion .....	102
3.8	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion in Abhängigkeit vom Zugabezeitpunkt des Bi-Ammoniumcitrats .....	105
3.8.1	Bismutzugabe vor Erreichen der max. $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktionsrate $V_{\text{maxTest}}$ im Kontrollansatz .....	105
3.8.2	Bismutzugabe nach Erreichen der max. $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktionsrate $V_{\text{maxTest}}$ im Kontrollansatz .....	107
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>110</b>
4.1	Rolle der Darmmikrobiota des Säugetierorganismus bei der Derivatisierung und Verteilung von Metall(oid)en .....	110
4.1.1	Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ im Blut von KONV- und KF-Mäusen nach Fütterung mit Bismut-haltigem Futter .....	111
4.1.2	Bestimmung des Gesamtbismutgehaltes in Leber, Lunge, Nieren, Hoden und Hirn von Tieren der KONV- und KF-Gruppe nach Fütterung mit Bismut-haltigem Futter .....	112

---

4.2	Untersuchungen zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Bismut-Methylierung in <i>M. mazei</i> .....	113
4.2.1	Abiotische (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Bildung.....	114
4.2.2	Biotische (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Bildung.....	116
4.2.3	Kinetik der (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi -Produktion: Hinweis auf die enzymatische Bildung eines essenziellen Intermediates.....	116
4.2.4	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Produktion versus CoM-Methylierung: Abhängigkeit und Konkurrenz.....	119
4.2.5	Einfluss von Bi-Ammoniumcitrat auf die (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Produktion und die Methylierung von CoM.....	121
5	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>122</b>
6	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>123</b>
7	<b>Anhang.....</b>	<b>133</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Bismutkristall.....	3
Abb. 2	Schema der Methylgruppenübertragung von Mono-, Di- oder Trimethylamin....	6
Abb. 3	Coenzym M.....	6
Abb. 4	Cobalamin (Methylcobalamin: R –CH <sub>3</sub> , Coenzym B <sub>12</sub> (= AdoCob): R = 5`-Desoxyadenosyl, Cyanocobalamin (= Vitamin B <sub>12</sub> ): R = -CN, Hydroxycobalamin (= Vitamin B <sub>12a</sub> ): R = -OH (Banerjee <i>et al.</i> 2003). ....	7
Abb. 5	Eichgerade für Superose 10/300 GL.....	26
Abb. 6	Eichgerade für HiLoad 26/60 Superdex 200.....	28
Abb. 7	Schematischer Aufbau des ICP-MS als Detektionseinheit. ....	33
Abb. 8	Schematischer Aufbau des Purge-and-Trap-GC.....	35
Abb. 9	Versuchsaufbau zur ‚Online‘-Messung von (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi .....	36
Abb. 10	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Gehalt im Blut der KONV-Untergruppen nach 2-wöchiger Bismut-Diät. Die Analyse erfolgte nach 5-minütigem Spülen der Probe mit Helium. ....	46
Abb. 11	Mittlere Bismutgehalte [nmol g <sup>-1</sup> TG] der Organe und Blutproben der Gruppe 1 – 3. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der gemessenen Bismutkonzentrationen mit Standardabweichungen.....	47
Abb. 12	Verhältnis der absoluten Bismutgehalte [nmol g <sup>-1</sup> TG] der Organe der einzelnen Untergruppen der KONV-Gruppe und dem (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Gehalt der Blutproben der Untergruppen.....	48
Abb. 13	Typisches Chromatogramm einer PT-GC/ICP-MS-Analyse (Methode ‚Purge and Trap‘) nach Injektion von 1 ml Gasphase eines <i>in vitro</i> -Ansatzes nach 5-minütiger Inkubation mit 600 µg ml <sup>-1</sup> Rohextrakt von <i>M. mazei</i> , 1500 µM CoM, 10 µM Bismut-Ammonium-Citrat und 750 µM MeCob und 100 µl des (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Se-Standards. Der Ansatz wurde durch Zugabe des Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix gestartet.....	51
Abb. 14	Typischer Kurvenverlauf der (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Produktion einer ICP-MS-Messung (Methode 2 ‚online‘) eines <i>in vitro</i> -Ansatzes mit 600 µg ml <sup>-1</sup> Rohextrakt von <i>M. mazei</i> , 1500 µM CoM, 10 µM Bismut-Ammonium-Citrat im Protein- Vorinkubations-Mix und 750 µM MeCob. Reaktionsstart-Mix. ....	52
Abb. 15	Verlauf der abiotischen Bildung von (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi nach Belichtung. Die Ansätze wurden in Abwesenheit und in Gegenwart des Radikalfängers tert. Butanol durchgeführt. Zusammensetzung der Reaktionsansätze: Ansatz a): 2000 µM MeCob und 5 µM Bi-Ammoniumcitrat in 50 mM Hepes pH 7,0; Start durch Zugabe von MeCob, nach 100 sec Belichtung mit einer 125 W Halogenlampe bis zum Ende der Messung Ansatz b): wie a), aber	

	zusätzliche Zugabe von 50 mM tert. Butanol (Endkonzentration: 50mM) zum Start. ....	54
Abb. 16	Verlauf der abiotischen Bildung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ nach Zugabe von 1000 $\mu\text{M}$ TiCit. Der Reaktionsansatz mit 50 mM Hepes pH7,0 und 5 $\mu\text{M}$ Bi-Ammoniumcitrat wurde im Dunkeln durch Zugabe von MeCob (Endkonzentration 2000 $\mu\text{M}$ ) gestartet; nach 20 sec wurde TiCit zugegeben. ...	56
Abb. 17	UV/VIS-Spektrum des durch elektrochemische Reduktion aus Aquocobalamin hergestellten Cob(I). ....	57
Abb. 18	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung in einem abiotischen <i>in vitro</i> -Bismut-Methylierungs-Ansatz mit 500 $\mu\text{M}$ Cob(I) ( $n = 3$ ). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Reaktionsstart-Mix aus 5 $\mu\text{M}$ Bi-Ammoniumcitrat und 260 $\mu\text{M}$ MeCob in 50 mM Hepes pH 7,0 zu Cob(I) gestartet. ....	58
Abb. 19	Vergleich der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion [ $\text{pmol mg}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ Gasphase] in biotischen und abiotischen Reaktionsansätzen mit CoM (1500 $\mu\text{M}$ ) und ohne CoM sowie in einem Ansatz mit Hitze-inaktiviertem Rohextrakt. Aufgetragen sind die Zeitpunkte der Probennahme [min] gegen die Menge an $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ [ $\text{pmol je ml der Gasphase}$ ]. Alle Ansätze enthielten jeweils 10 $\mu\text{M}$ Bi-Ammoniumcitrat und wurden durch Zugabe von MeCob (Endkonzentration 750 $\mu\text{M}$ ) gestartet. Die biotischen Ansätze enthielten 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$ dialysierten Rohextrakt von <i>M. mazei</i> . Jeweils 1-ml-Aliquots der Gasphase entnommen und auf ihren $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Gehalt analysiert. ....	59
Abb. 20	Schrittweise Zugabe der benötigten Reaktanten zu einem biotischen Bismut-Methylierungs-Ansatz ( $n = 3$ ). Der Ansatz enthielt 50 mM Hepes pH 7,0 und 10 $\mu\text{M}$ Bi-Ammoniumcitrat in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Nach Zugabe von dialysiertem Rohextrakt (Endkonzentration 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) zum Zeitpunkt 0 und MeCob (Endkonzentration 750 $\mu\text{M}$ ) nach 5 min ist fast keine $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion zu erkennen. Erst nach Zugabe von CoM (Endkonzentration 1500 $\mu\text{M}$ ) 10 min nach Reaktionsstart erfolgt eine nachweisbare $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion (hier: 15 $\text{pmol mg}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in 5 min). ....	60
Abb. 21	Schematische Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte zur Anreicherung der Bismut-methylierenden Proteinfraktion aus Rohextrakt von <i>M. mazei</i> . ....	62
Abb. 22	Chromatogramm der Q-Sepharose-Chromatografie zur Anreicherung der Bismut-methylierenden Proteinfraktion. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten (0 – 1 mM NaCl in 50 mM Hepes pH7,0). Die methylierenden Fraktionen 31 – 39 eluierten bei NaCl-Konzentrationen zwischen 580 und 730 mM. ....	63

- Abb. 23 Chromatogramm der Hydroxylapatit-Chromatografie zur Anreicherung der Bismut-methylierenden Proteinfraktion. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten (0 – 1 mM NaCl in 50 mM Hepes pH7). Die methylierenden Fraktionen 4 – 15 eluierten bei NaCl-Konzentrationen zwischen 90 und 330 mM, die Fraktionen 27 – 37 NaCl-Konzentrationen zwischen 590 und 810 mM.....64
- Abb. 24 Chromatogramm der Größenausschluss-Chromatografie 1. Die methylierenden Fraktionen 7 – 9 weisen Proteine mit einer theoretischen molekularen Masse von 39,8 bzw. 10 kDa (vergl. Eichgerade Superose 10/300 GL (s. 2.2.3.1)).....65
- Abb. 25 SDS-PAGE-Gelelektropherogramm der Bismut-methylierenden Proteinfractionen aus *M. mazei* nach chromatografischer Auftrennung über Q-Sepharose-, Hydroxylapatit- und Größenausschluss-Chromatografie. ....66
- Abb. 26 SDS-PAGE-Elektropherogramm der Fraktionen nach Ni-NTA Chromatografie mit Rohextrakt von rekombinanten *E. coli*-Zellen, die die archaeale Methyltransferase MtbA orf 1438 von *M. mazei* mit C-terminalem His-tag überexprimiert haben. ....68
- Abb. 27 SDS-PAGE-Gelelektropherogramm der Fraktionen nach Q-Sepharose-Chromatografie mit Rohextrakt von rekombinanten *E. coli*-Zellen, die die archaeale Methyltransferase MtbA orf 1438 ohne His-tag von *M. mazei* überexprimiert haben. Zur Größenabschätzung des angereicherten Proteins wurde zusätzlich zum Proteinstandard ein Aliquot der rek. MtbA mit C-terminalem His-tag aufgetragen. ....70
- Abb. 28 SDS-PAGE der Fraktionen nach Größenausschluss-Chromatografie mit Rohextrakt von rekombinanten *E. coli*-Zellen, die die archaeale Methyltransferase MtbA orf 1438 ohne His-tag von *M. mazei* überexprimiert haben. Zur Größenkontrolle wurde zusätzlich zum Proteinstandard ein Aliquot der rek. MtbA mit C-terminalem His-tag aufgetragen.....71
- Abb. 29 SDS-PAGE-Gelelektropherogramm der rek. MtbA mit C-terminalem His-tag (nach Ni-NTA-Chromatografie) und der einzelnen Reinigungsschritte (Q-Sepharose- und Größenausschluss-Chromatografie) der rek. MtbA ohne C-terminalem His-tag zum Qualitätsvergleich der Reinigungsfractionen .....73
- Abb. 30 Auswirkungen der Lagerungsbedingungen und der eingesetzten Konzentration der MtbA auf  $V_{\max\text{Test}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und Lag-Phase der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion; (Mittelwerte mit Standardabweichungen,  $n = 3$ ). Die Bismut-Methylierungs-Assays enthielten jeweils 500  $\mu\text{M}$  CoM, 2000  $\mu\text{M}$

- MeCob und 5  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat und die Reaktion wurde durch Zugabe des Protein-Vorinkubations-Mix (MtbA in 50 mM Hepes pH 7,0) gestartet. ....76
- Abb. 31 Präparation I der rek. MtbA: Einfluss der Enzymkonzentration in Gegenwart / Abwesenheit von CoM im Protein-Vorinkubations-Mix auf  $V_{\text{maxTest}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und die Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 4$ ). Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des jeweiligen Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix gestartet.....78
- Abb. 32 Präparation II der rek. MtbA: Einfluss der Enzymkonzentration in Gegenwart / Abwesenheit von CoM im Protein-Vorinkubations-Mix auf  $V_{\text{maxTest}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und die Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. MtbA (Präparation II) von *M. mazei*; (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 4$ ). Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des jeweiligen Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix gestartet.....79
- Abb. 33 Einfluss der Enzymkonzentration der Präparationen I (rot) und II (blau) der rek. MtbA in Gegenwart von CoM im Protein-Vorinkubations-Mix auf  $V_{\text{maxTest}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und die Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion. Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des jeweiligen Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix gestartet.....80
- Abb. 34 Cobalamin-Spektren in 50 mM Kaliumphosphat pH 7,2 (modifiziert nach (Kreft et al. 1994)). .....82
- Abb. 35 Veränderung des MeCob-UV/VIS-Spektrums (200 – 600 nm) im Laufe der enzymatisch katalysierten Transmethylierung von MeCob zu CoM über den Zeitraum von 7 min. Die Ansätze enthielten 260  $\mu\text{M}$  MeCob, 1500  $\mu\text{M}$  CoM und 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MtbA in 50 mM Hepes pH 7,0 und wurden unter Rotlicht im Anaerobenzelt in gasdichten, sauerstofffreien Quarzglasküvetten angesetzt. Der Ansatz wurde durch Zugabe von MeCob gestartet. ....83
- Abb. 36 Spektrofotometrisch verfolgte Demethylierung von MeCob (Absorptionsmaximum 520 nm) und Bildung von Cob(I) (Absorptionsmaximum 388 nm) in anaeroben *in vitro*-Assays mit 1500  $\mu\text{M}$  CoM und 10  $\text{mg ml}^{-1}$  MtbA Präp. I. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeCob (Endkonzentration 260  $\mu\text{M}$ ) gestartet.....85
- Abb. 37 Spektrofotometrisch verfolgte Demethylierung von MeCob (Absorptionsmaximum 520 nm) und Bildung von Cob(I) (Absorptionsmaximum 388 nm) in anaeroben *in vitro*-Assays mit 1500  $\mu\text{M}$

- CoM und  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  MtbA Präp. II. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeCob (Endkonzentration  $260 \text{ }\mu\text{M}$ ) gestartet.....85
- Abb. 38 Veränderung des MeCob-UV/VIS-Spektrums (200 – 600 nm) in Gegenwart von Bi-Ammoniumcitrat im Laufe der enzymatisch katalysierten Transmethylierung von MeCob zu CoM. Die Ansätze enthielten  $260 \text{ }\mu\text{M}$  MeCob,  $1500 \text{ }\mu\text{M}$  CoM,  $10 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  MtbA und  $75 \text{ }\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat in  $50 \text{ mM}$  Hepes pH7,0 und wurden in gasdichten, sauerstofffreien Quarzglaszküvetten unter Rotlicht im Anaerobenzelt angesetzt. Der Ansatz wurde durch Zugabe von MeCob gestartet. ....87
- Abb. 39 Spektrofotometrisch verfolgte Demethylierung von MeCob (Absorptionsmaximum  $520 \text{ nm}$ ) und Bildung von Cob(I) (Absorptionsmaximum  $388 \text{ nm}$ ) in anaeroben *in vitro*-Assays mit  $1500 \text{ }\mu\text{M}$  CoM und  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  MtbA Präp. II. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeCob (Endkonzentration  $260 \text{ }\mu\text{M}$ ) gestartet. Nach 2 min wurde Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration  $75 \text{ }\mu\text{M}$ ) anaerob zugegeben.....88
- Abb. 40 Typisches Chromatogramm einer PT-GC/ICP-MS-Analyse (Methode ‚Purge and Trap‘) der Gasphase nach Ethylierung eines abiotischen *in vitro*-Assays mit  $5 \text{ }\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat und  $2000 \text{ }\mu\text{M}$  MeCob in  $50 \text{ mM}$  Hepes pH 7,0. Die Reaktion wurde im Dunkeln durch Zugabe von TiCit (Endkonzentration  $100 \text{ }\mu\text{M}$ ) gestartet und nach 15-minütiger Inkubation im Schüttler bei  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde ein Aliquot der Flüssigphase mit Natriumtetraethylborat ethyliert.....89
- Abb. 41  $V_{\text{maxTest}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ] der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 6$ ) in Abhängigkeit von unterschiedlichen MeCob-Konzentrationen [ $150 - 2000 \text{ }\mu\text{M}$ ]. Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe Protein-Vorinkubations-Mix (jeweils  $10 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  rek. MtbA,  $1 \text{ }\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat und  $500 \text{ }\mu\text{M}$  CoM in  $50 \text{ mM}$  Hepes pH7,0) zum Reaktionsstart-Mix (MeCob) in den Reaktionsgefäßen gestartet.....92
- Abb. 42  $V_{\text{maxTest}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ] der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion in Abhängigkeit von unterschiedlichen CoM-Konzentrationen ( $100 - 500 \text{ }\mu\text{M}$ ) und unterschiedlichen Bi-Ammoniumcitrat-Konzentrationen ( $1 - 10 \text{ }\mu\text{M}$ ) jeweils in drei parallelen Ansätzen (a – c). Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des Protein-Vorinkubations-Mix (jeweils  $10 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  rek. MtbA sowie die entsprechenden CoM- und Bi-Ammoniumcitrat-Konzentrationen) zum Reaktionsstart-Mix (MeCob) in den Reaktionsgefäßen gestartet.....93
- Abb. 43  $V_{\text{maxTest}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ] der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 3 - 9$ ) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Bi-Ammoniumcitrat-Konzentrationen ( $0,01 - 100 \text{ }\mu\text{M}$ ). Die

	Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des Protein-Vorinkubations-Mix (jeweils 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ rek. MtbA und 500 $\mu\text{M}$ CoM in 50 mM Hepes pH 7,0) zum Reaktionsstart-Mix (2000 $\mu\text{M}$ MeCob) in den Reaktionsgefäßen gestartet. ....	94
Abb. 44	$V_{\text{maxTest}}$ [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ] und Lag-Phase [sec] der enzymatischen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. MtbA von <i>M. mazei</i> in Gegenwart von CoM $\pm$ Bi-Ammoniumcitrat, DTT und GSH; (Mittelwerte mit Standardabweichung, $n = 6$ ) .....	98
Abb. 45	Einfluss nicht-thiolhaltiger Reduktionsmittel auf $V_{\text{maxTest}}$ [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ] und die Lag-Phase [sec] der enzymatischen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. MtbA von <i>M. mazei</i> in Gegenwart von TCEP, TiCit, CoM, Bi-Ammoniumcitrat oder $\text{ZnSO}_4$ ; (Mittelwerte mit Standardabweichung, $n = 6$ ) Das Enzym wurde in den verschiedenen Ansätzen zusätzlich zu den Reduktionsmitteln TiCit bzw. TCEP in unterschiedlichen Kombinationen mit CoM, Bi-Ammoniumcitrat und $\text{Zn}(\text{SO})_4$ vorinkubiert (jeweils 180 min). Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des jeweiligen Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix gestartet. Zum Vergleich sind die Varianten A1 (Protein ohne Vorinkubation) mit CoM und A2 (Enzym 180 min nur mit CoM vorinkubiert) einbezogen. ....	101
Abb. 46	Einfluss der Oxidationsmittel $\text{H}_2\text{O}_2$ und $(\text{CoM})_2$ auf $V_{\text{maxTest}}$ [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ] und die Lag-Phase [sec] der enzymatischen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. MtbA von <i>M. mazei</i> ; (Mittelwerte mit Standardabweichung, $n = 6$ ). Die Oxidationssmittel wurden simultan zum Reaktionsstart zugegeben. Zum Vergleich sind die Reaktionsansätze A1 – 5 einbezogen. Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des jeweiligen Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix gestartet.....	104
Abb. 47	„Online“-ICP-MS-Messungen von <i>in vitro</i> -Bismut-Methylierungs-Assays mit 500 $\mu\text{M}$ CoM und 2000 $\mu\text{M}$ MeCob ( $n = 2$ ). Alle Ansätze wurden durch Zugabe des Enzyms (Endkonzentration 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) zum Zeitpunkt 0 sec gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wird Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration 5 $\mu\text{M}$ ) zugegeben. ....	106
Abb. 48	„Online“-ICP-MS-Messungen von <i>in vitro</i> -Bismut-Methylierungs-Assays mit 500 $\mu\text{M}$ CoM und 2000 $\mu\text{M}$ MeCob. Alle Ansätze wurden durch Zugabe des Enzyms (Endkonzentration 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) gestartet. Nach 325 sec wurde Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration 5 $\mu\text{M}$ ) zugegeben, nach 420 sec MeCob (Endkonzentration 4000 $\mu\text{M}$ ) und nach 530 sec CoM (Endkonzentration 1000 $\mu\text{M}$ ).....	108

---

Abb. 49	„Online“-ICP-MS-Messung eines <i>in vitro</i> -Bismut-Methylierungs-Assays mit 500 $\mu\text{M}$ CoM und 2000 $\mu\text{M}$ MeCob ( $n = 3$ ). Der Ansatz wurde durch Zugabe des Enzyms (Endkonzentration 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) gestartet. Nach 355 sec wurden Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration 5 $\mu\text{M}$ ) zugegeben, nach 500 sec CoM (Endkonzentration 1000 $\mu\text{M}$ ) und nach 640 sec MeCob (Endkonzentration 2200 $\mu\text{M}$ ). .....	109
Abb. 50	Hypothetisches Reaktionsschema der TiCit- bzw. Cob(I)- induzierten $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung .....	115
Abb. 51	Hypothetische Reaktionsgleichung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung in Gegenwart von TiCit. ....	115
Abb. 52	Hypothetische Reaktionsgleichung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung in Gegenwart von Cob(I).....	115
Abb. 53	Hypothetisches Reaktionsschema der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung im Anschluss an die Enzym-katalysierte Methylierung von CoM und Entstehung von Cob(I). ....	118
Abb. 54	Hypothetische Reaktionsgleichung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung im Anschluss an die Enzym-katalysierte Methylierung von CoM und Entstehung von Cob(I). ....	118

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Plasmide .....	15
Tab. 2	Sequenzen der verwendeten Primer (Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind fett, mutierte Nukleotide kursiv markiert) .....	20
Tab. 3	Chromatografie-Protokoll Q-Sepharose .....	24
Tab. 4	Chromatografie-Protokoll Hydroxylapatit .....	24
Tab. 5	Chromatografie-Protokoll Superose 10/300 GL .....	25
Tab. 6	Chromatografie-Protokoll Ni-NTA .....	26
Tab. 7	Chromatografie-Protokoll Q-Sepharose .....	27
Tab. 8	Chromatografie-Protokoll HiLoad 26/60 Superdex 200 .....	28
Tab. 9	Betriebsparameter des ICP-MS .....	31
Tab. 10	Siedepunkte und Retentionszeiten der Analyten unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen .....	39
Tab. 11	Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten, die zur Quantifizierung von MeCob und Cob(I) genutzt wurden .....	41
Tab. 12	Aufschlussprogramm MARS 5 Mikrowellensystem .....	41
Tab. 13	Versuchstiergruppen .....	42
Tab. 14	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Gehalt der Blutproben der KONV-Gruppe .....	45
Tab. 15	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Gehalt der Blutproben der KF-Gruppe .....	45
Tab. 16	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi -Gehalt der Blutproben der KONV-Kontroll-Gruppe .....	45
Tab. 17	Mittelwert und Standardabweichung der gemessenen Bismutkonzentration [nmol g <sup>-1</sup> TG] der Organe und Blutproben der KONV-, KF- und KONV-Kontroll-Gruppe. ....	47
Tab. 18	Einfluss unterschiedlicher TiCit-Konzentrationen (ohne und mit tert. Butanol) auf die V <sub>maxTest</sub> [pmol sec <sup>-1</sup> ] und die Lag-Phase [sec] in abiotischen in vitro-Bismut-Methylierungs-Assays. ....	55
Tab. 19	V <sub>maxTest</sub> der (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Produktion [nmol mg <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ] in in vitro-Bismut-Methylierungs-Assays mit Rohextrakt von rek. E. coli, der gereinigten rek. MtbA mit C-terminalem His-tag und der rek. MtbA ohne C-terminalem His-tag (je 10 µg ml <sup>-1</sup> der zu testenden Proteinprobe, 2000 µM MeCob, 500 µM CoM und 1 µM Bi-Ammoniumcitrat in 50 mM Hepes pH 7,0, (Gesamtvolumen 1 ml)) .....	74
Tab. 20	Konzentrationen und Lagerungsbedingungen der rek. MtbA (frische MtbA = direkt nach Aufreinigung, s. 2.2.3.2) .....	75
Tab. 21	Absorptionsmaxima der Cobalamin-Derivate .....	82
Tab. 22	Retentionszeiten der detektierten Bismutderivate .....	89



Tab. 23	Mittelwerte ( $\pm \sigma$ ) der Peakmaxima [cps] der detektierten flüchtigen Bismutderivate nach Ethylierung mit Natriumtetraethylborat .....	90
Tab. 24	Konzentrationen der obligat eingesetzten Assay-Komponenten.....	96
Tab. 25	Komponentenzusammensetzung im Protein-Vorinkubations-Mix und Reaktionsstart-Mix zu 3.7.3.1.....	97
Tab. 26	Varianten der Komponentenzusammensetzung im Protein-Vorinkubations-Mix und Reaktionsstart-Mix zu 3.7.3.2 .....	100
Tab. 27	Varianten der Komponentenzusammensetzung im Mastermix und den Reaktionsgefäßen zu 3.7.3.3 .....	103
Tab. 28	$V_{\max\text{Test}}$ [pmol mg <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ] und die Lag-Phase [sec] nach Reaktionsstart, (jeweils mit Standardabweichungen, n = 3) nach Zugabe von Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration 5 µM) zu verschiedenen Zeitpunkten. Alle Bismut-Methylierungs-Assays enthielten 500 µM CoM, 2000 µM MeCoB in 50 mM Hepes pH 7,0 und wurden durch Zugabe des geschädigten Enzyms (Endkonzentration 10 µg ml <sup>-1</sup> ) gestartet.....	107
Tab. 29	Mittelwert ( $\pm \sigma$ ) der gemessenen Bismutkonzentration [nmol g <sup>-1</sup> TG] der Organe und Blutproben der KONV-, KF- und KONV-Kontroll-Gruppe. ....	133
Tab. 30	$V_{\max\text{Test}}$ [nmol mg <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ] und Lag-Phase [sec] der enzymatischen (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Produktion durch die rek. MtbA Präp. I von M. mazei in Gegenwart / Abwesenheit von CoM im Protein-Vorinkubations-Mix (Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 4) bei verschiedenen Konzentrationen der MtbA im Bismut-Methylierungs-Assay.....	134
Tab. 31	$V_{\max\text{Test}}$ [nmol mg <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ] und Lag-Phase [sec] der enzymatischen (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Produktion durch die rek. MtbA Präp. II von M. mazei in Gegenwart / Abwesenheit von CoM im Protein-Vorinkubations-Mix (Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 4) bei verschiedenen Konzentrationen der MtbA im Bismut-Methylierungs-Assay .....	134
Tab. 32	$V_{\max\text{Test}}$ [nmol mg <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ] der (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Produktion bei verschiedenen Bismutkonzentrationen in Abhängigkeit von der CoM-Konzentration in enzymatischen Bismut-Methylierungs-Assays .....	135
Tab. 33	$V_{\max\text{Test}}$ [nmol mg <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ] und Lag-Phase [sec] der enzymatischen (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Produktion durch die rek. MtbA von M. mazei in Gegenwart von CoM +/- Bi-Ammoniumcitrat, DTT und GSH; (Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 6) .....	135
Tab. 34	$V_{\max\text{Test}}$ [nmol mg <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ] und Lag-Phase [sec] der enzymatischen (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi-Produktion durch die rek. MtbA von M. mazei in Gegenwart von	

---

	TCEP, TiCit, CoM, Bi-Ammoniumcitrat oder $\text{ZnSO}_4$ ; (Mittelwerte mit Standardabweichung, $n = 4$ ) .....	136
Tab. 35	$V_{\text{maxTest}}$ [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und Lag-Phase [sec] der enzymatischen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. MtbA von <i>M. mazei</i> in Gegenwart von $\text{H}_2\text{O}_2$ und $(\text{CoM})_2$ (Mittelwerte mit Standardabweichung, $n = 4$ ).....	137
Tab. 36	Spektrofotometrisch-bestimmte mittlere MeCob- und Cob(I)-Konzentrationen [ $\mu\text{M} \pm \sigma$ , $n = 3$ ] in anaeroben in vitro-Assays mit Enzym-Präp. I oder II. Die Assays enthielten 1500 $\mu\text{M}$ CoM und 10 $\text{mg ml}^{-1}$ MtbA (Präp. I oder II) in 50 mM Hepes und wurden durch Zugabe von MeCob (Endkonzentration 260 $\mu\text{M}$ ) gestartet.....	138

## Abkürzungsverzeichnis

x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
%	Prozent (der hundertste Teil von)
$\sigma$	Standardabweichung
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
®	eingetragenes Warenzeichen
°C	Grad Celsius
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AU	Absorbance Units
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
Bi	Bismut-Ammoniumcitrat
Bi-Ammoniumcitrat	Bismut-Ammoniumcitrat
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
c	Zenti
ca.	circa
Camp	Chlroamphenicol
CBS	kolloidales Bismut-Subcitrat (Colloidal Bismuth Subcitrate)
Cob(I)	Cob(I)alamin
CoM	Coenzym M
cps	counts per second
d	Tage
d. h.	das heißt
DL	unter Detektions-Limit
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
Endkonzentration	Endkonzentration
et al.	et alteri
etc.	et cetera

EtOH	Ethanol
F	Fraktion
f	femto ( $10^{-15}$ )
g	Gramm
GSH	Glutathion
h	Stunde, Stunden
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
ICP-MS	Massenspektrometrie mit Plasma-Anregung
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
K	Kelvin
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KF	keimfreie Mäuse
KONV	konventionell gezogene Mäuse
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
m	Meter
m	Mittelwert
m	milli ( $10^{-3}$ )
M	Molekulargewichts-Marker
max.	Maximum / maximal
MeCob	Methyl-(III)cobalamin
Mill.	Million, Millionen
min	Minuten
M	molar ( $\text{mol l}^{-1}$ )
$m/z$	Masse-Ladungs-Verhältnis
n	nano ( $10^{-9}$ )
n	Anzahl der Stichproben
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriaceticacid
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
orf	open reading frame
p	piko ( $10^{-12}$ )
p. a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline (Phosphate Buffered Saline)

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration
ppm / ppb	der millionste / billionste Teil von (parts per million / billion)
psi	pound per square inch
PT-GC	„Purge and Trap“-Gaschromatografie
rek.	rekombinant
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	siehe
sec	Sekunde, Sekunden
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
tert. Butanol	tertiäres Butanol
TG	Trockengewicht
TiCit	Titan-(III)Citrat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
% (v/v)	Volumenprozent
VE	vollentsalztes Wasser
vergl.	vergleiche
W	Watt
% (w/v)	Gewichtsprozent
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

## 1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Erforschung der biotischen und abiotischen Voraussetzungen, die für die Bildung flüchtiger Metall(oid)spezies nötig sind. Durch biologische oder chemische Alkylierung und Hydrierung können die Eigenschaften von Metall(oid)en deutlich verändert werden. Permethylierte Metall(oid)e und ihre entsprechenden Hydrid-Derivate sind aufgrund ihres hohen Dampfdrucks leicht flüchtig und können sich so unkontrolliert in der Umwelt verteilen. Das kann wegen der höheren Toxizität dieser Verbindungen gravierende Folgen haben.

### Gefahrenpotenzial flüchtiger Metall(oid)-Derivate

Flüchtige Metall(oid)-Derivate weisen durch ihre erhöhte Hydrophobizität eine bessere Membranpermeabilität auf und können so im Organismus wesentlich toxischer wirken als ihre anorganischen Edukte.

Generell geht von alkylierten Metall(oid)-Verbindungen eine große Gefährdung biologischer Systeme aus, zum Beispiel Neurotoxizität, Behinderung des Ionentransports und der Energiekonservierung, Schädigung des Erbgutes (Leonard 1980; Thayer 1984; Klimecki *et al.* 1995; Thayer 1995; Dopp *et al.* 2004). Neurotoxizität konnte für  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ ,  $(\text{CH}_3)_4\text{Pb}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{Te}$  nachgewiesen werden (Sollmann *et al.* 1939; Hathaway *et al.* 1991; Laden *et al.* 2001). Durch die hohe Affinität dieser Derivate zu Schwefel- und Stickstoffgruppen können sie enzymatische Reaktionen blockieren (Sollmann *et al.* 1939; Thayer 1984; Hathaway *et al.* 1991; Klimecki *et al.* 1995; Laden *et al.* 2001; Andrewes *et al.* 2004; Dopp *et al.* 2004).

$(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$  wirkt genotoxisch (Andrewes *et al.* 2004) und methylierte Quecksilberverbindungen schädigen das zentrale Nervensystem (Craig 2003). So wurde in Säugetieren eine, gegenüber Fischen, z. T. 100-fach stärkere Anreicherung im Gehirn nachgewiesen (Boening 2000). Zudem wurde für methylierte Quecksilberverbindungen der Einfluss auf Chromosomenaberrationen in Säugetierzellen gezeigt (Fender *et al.* 1998; Ehrenstein *et al.* 2002).

In der Vergangenheit kam es wiederholt zu teilweise tragischen Unfällen durch den Kontakt von Menschen mit biomethylierten Metall(oid)-Derivaten. So kam es im 19. Jahrhundert zu tödlichen Vergiftungen durch Umwandlung von arsenhaltigen Pigmenten in Wandfarben (Scheeles Grün und Pariser Grün) durch Schimmelpilze (vermutlich *Scopulariopsis brevicaulis*) (Gosio 1897) zu Trimethylarsin (Challenger *et al.* 1933; Challenger 1945). In Japan kam es zwischen 1941 und 1956 (Luke *et al.* 1982) zu mehreren tausend Intoxikationen, (teilweise mit Todesfolge), durch die Akkumulation organischer Quecksilberverbindungen in Speisefischen (Westöö 1966), und die

Anreicherung von Methylquecksilber beinhaltenden Fungiziden in Getreide führte zu Vergiftungen und Todesfällen im Irak (Bakir *et al.* 1973).

### Entstehung methylierter Metall(oid)-Spezies

In der Umwelt stellen methylierte Metall(oid)e die Mehrzahl der flüchtigen Derivate. Methylierung kann sowohl abiotisch erfolgen, zum Beispiel durch Transmethylierung (Übertragung der Methylgruppe von einem Metall(oid) zum anderen (Fergusson 1991)) oder durch Übertragung von Methylgruppen, die fotochemisch aus organischen Molekülen entstehen (Craig 1986) als auch biotisch. Es ist seit langem bekannt, dass Mikroorganismen Metall(oid)e, wie Arsen, Antimon, Bismut, Selen, Tellur und Quecksilber durch Alkylierung und Hydrierung in flüchtige Verbindungen umwandeln können (Gadd *et al.* 1993; Michalke *et al.* 2000; Bentley *et al.* 2002; Michalke *et al.* 2002b; Thayer 2002; Craig 2003; Michalke *et al.* 2004; Meyer *et al.* 2007; Michalke *et al.* 2007; Meyer *et al.* 2008). Dabei gelten besonders methanogene Archaea anaerober Habitate als Hauptverantwortliche für die Biomethylierung von Metall(oid)en (Michalke *et al.* 2000; Michalke *et al.* 2002b; Michalke *et al.* 2004; Meyer 2007; Michalke *et al.* 2007; Meyer *et al.* 2008). Besonders effektiv wird, neben Selen, Bismut in sein permethyliertes Derivat Trimethylbismut ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi) umgesetzt.

Methylierte Metall(oid)-Derivate konnten in Ausgasungen aus Sedimenten und Feuchtgebieten (Wickenheiser *et al.* 1998), Geothermalquellen (Hirner *et al.* 1998) sowie in Faulgasen von Kläranlagen und Mülldeponien (Feldmann *et al.* 1994; Feldmann *et al.* 1995) sowie in humanen Fäzes nach Einnahme eines Bismut-haltigen Medikaments (Michalke *et al.* 2008) nachgewiesen werden.

Bislang ist erst wenig über die molekularen Mechanismen der Metall(oid)-Biomethylierung bekannt. Methylierungsreaktionen spielen generell eine wichtige Rolle im Stoffwechsel von Organismen. Dabei stehen mehrere Substanzen als Methylgruppendonoren zur Verfügung, zum Beispiel Methylcobalamin (CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub>), S-Adenosylmethionin (SAM) und N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat (MTHF) (Ridley *et al.* 1977), die an enzymatischen Reaktionen des C1-Stoffwechsels beteiligt sind. SAM und MTHF übertragen die Methylgruppe als Carbonium-Ion (CH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Die Methylgruppe des CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub> kann sowohl als Radikal (CH<sub>3</sub><sup>•</sup>), Carbonium- (CH<sub>3</sub><sup>+</sup>) als auch als Carbanion (CH<sub>3</sub><sup>-</sup>) übertragen werden (Ridley *et al.* 1977). Allerdings konnte erst in wenigen Fällen eine enzymatisch katalysierte Methylierung von Metall(oid)en nachgewiesen werden: Die Methylierung von Arsen in Abhängigkeit von der Anwesenheit von zellfreien Extrakten von *Methanobacterium* M.o.H. konnte erstmals in Gegenwart von CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub> nachgewiesen werden (McBride *et al.* 1971). Die Methylierung von Quecksilber durch zellfreien Extrakt von *Desulfovibrio desulfuricans* LS wurde von (Choi *et al.* 1994) beobachtet. Aus eukaryotischen Leberzellen konnten SAM-abhängige

Arsenit-Methyltransferasen isoliert werden (Zakharyan et al. 2001; Thomas et al. 2004; John et al. 2008). In *Rhodopseudomonas palustris* konnte die Arsenit-Methyltransferase ArsM identifiziert werden, die die Bildung des flüchtigen  $\text{As}(\text{CH}_3)_3$  katalysiert (Jie Qin et al. 2005). Bis jetzt sind keine weiteren Methyltransferasen bekannt, die Metall(oid)e transformieren können.

### Bismut

Bismut findet als Perlglanzpigment ebenso Verwendung in der Herstellung dekorativer Kosmetik wie auch bei der Produktion von Medikamenten gegen Magengeschwüre und Hämorrhoiden (Fickling 1999). Bismut wurde früher als harmlos und nicht-toxisch angesehen. Mittlerweile hat sich gezeigt, dass eine hochdosierte Langzeiteinnahme von Bismut-haltigen Medikamenten toxische Nebenwirkungen wie Nierenleiden, Enzephalopathien, Osteoarthropathien, Gingivitis, Stomatitis oder Colitis haben kann (Buge et al. 1974; Burns et al. 1974; Slikkerveer et al. 1989). Für die Einnahme geringer Konzentrationen von kolloidalem Bismutsubcitrat (Colloidal Bismuth Subcitrate, CBS) konnten allerdings bislang keine toxischen Effekte beobachtet werden (Noach et al. 1995).



**Abb. 1** Bismutkristall

### Biomethylierung im Säugetierorganismus

Wie bereits dargestellt, sind Mikroorganismen, besonders methanogene Archaea anaerober Habitate besonders versatil in der Biomethylierung von Metall(oid)en. Der Intestinaltrakt von Säugetieren stellt ebenfalls ein anaerobes Biotop dar, das von einer Vielzahl unterschiedlicher Bacteria und auch von Archaea besiedelt ist. Die am häufigsten vertretenen bakteriellen Vertreter im Darm von Menschen und Mäusen gehören zu den Phyla *Firmicutes* (darunter zu 95 % *Clostridia*) und *Bacteroidetes* (bis zu 65 verschiedene Arten, ubiquitär kommt *Bacteroides thetaiotaomicron* vor) (Hayashi et et al.; Hold et al. 2002; Wang et al. 2003; Eckburg et al. 2005; Ley et al. 2005). *Proteo-* sowie *Actino-* und *Fusobacteria* kommen nur in geringer Dichte vor. Die einzigen bisher identifizierten



Vertreter der Archaea sind *Methanobrevibacter smithii* und *Methanosphaera stadtmanae* (Miller *et al.* 1982; Miller *et al.* 1985; Eckburg *et al.* 2005; Buck S. Samuel *et al.* 2007). Lange Zeit galten diese Arten als einzige archaeale Vertreter der menschlichen Darmmikrobiota. Allerdings weisen neuere Untersuchungen auch auf das Vorliegen von Vertretern Crenarchaeota (zum Beispiel der *Sulfolobales*) im Darm hin (Rieu-Lesme *et al.* 2005).

### Biomethylierung im menschlichen Intestinaltrakt

In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe wurden humane Fäzesproben freiwilliger Probanden nach Einnahme Bismut-haltiger DeNol<sup>®</sup>-Tabletten (Gesamtbismut 215 mg) anaerob inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Menge an flüchtigen Metall(oid)verbindungen in der Gasphase der Proben vor und nach der Einnahme der Tabletten bestimmt. Bereits vor der Einnahme konnten kleine Mengen Trimethylbismut in den Stuhlproben detektiert werden. Nach der Medikamenteneinnahme wurden in den Proben aller 14 Probanden bis zu 500-mal größere Mengen an Trimethylbismut, aber auch Mono- und Dimethylbismut nachgewiesen. Außerdem führte die Einnahme und Methylierung von Bismut auch zu einer verstärkten Volatilisierung anderer Metall(oid)e. Es wurden unter anderem hydrierte und methylierte Arsen- und Antimonspezies sowie methylierte Tellur und Bleiverbindungen gefunden (Meyer *et al.* 2008).

In einer ähnlichen Probandenstudie konnten bereits 30 Minuten nach der Einnahme von DeNol<sup>®</sup>-Tabletten größere Mengen Trimethylbismut in der Atemluft (bis zu 458 ng m<sup>-3</sup>) und im Blut (bis zu 2,5 pg ml<sup>-1</sup>) der Probanden nachgewiesen werden (Boertz *et al.* 2009).

### Bismut-Biomethylierung in vitro

In Rohextrakten von *M. formicicum* konnte die Methylcobalamin-abhängige Genese von (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi beobachtet werden (Michalke 1999). Eine (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion, die sowohl von Methylcobalamin und Coenzym M abhängig ist, konnte in Vorversuchen zu dieser Arbeit auch in Rohextrakten des methanogenen Archaeums *Methanosarcina mazei* nachgewiesen werden, das in Reinkultur besonders hohe (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktionsraten aufweist. Nach Hitzebehandlung der Proteine des Rohextraktes konnte die Methylierungsaktivität nicht mehr festgestellt werden, was eine enzymabhängige Reaktion nahelegt. Da Methanoarchaea besonders versatil bei der Produktion von volatilen Bismutverbindungen sind, könnten Enzyme der Methanogenese für deren Bildung verantwortlich sein.

### Methanogenese

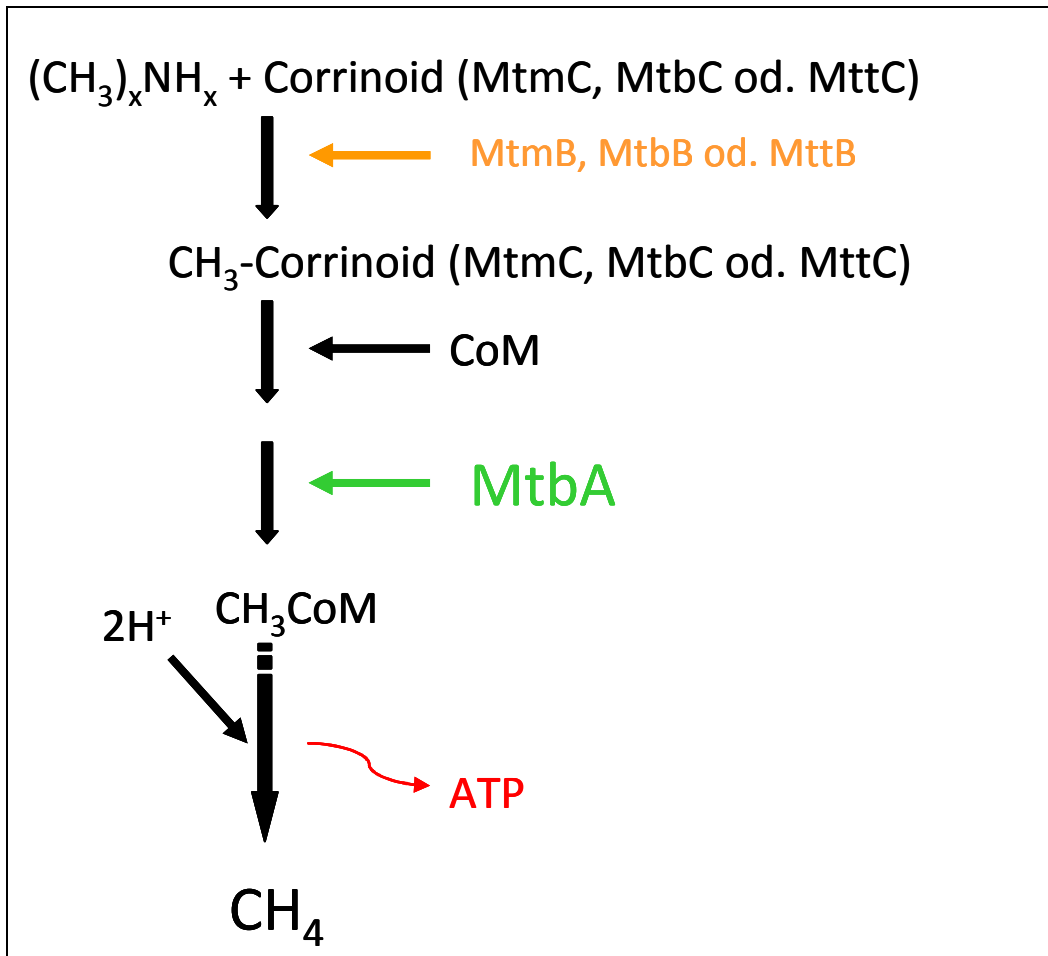
Die Methanogenese ist das gemeinsame Merkmal der Methanoarchaea, die besonders versatil in der (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion sind. Diese Beobachtung führte zu dem Verdacht, dass

die Methanogenese möglicherweise die Ursache für Fähigkeit dieser Organismen zur Methylierung ist.

Die Methanogenese ist die letzte Stufe des anaeroben Abbaus von Biomasse zur Energiegewinnung. Der anaerobe Abbau von Biomasse findet in drei Schritten statt: Hydrolyse, Acetogenese und Methanogenese. Die Produkte der Hydrolyse und der Acetogenese (beispielsweise Essigsäure, Methanol, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff) werden in der Methanogenese in Methan umgewandelt. Diese Umsetzungen sind exergon, sodass die Methanbildung den Methanogenen als Energiequelle dienen kann. Methanosarcinales können das größte Substratspektrum aller Methanogene nutzen, das  $H_2 + CO_2$  sowie Acetat und  $C_1$ -Verbindungen wie Methanol, Mono-, Di- und Trimethylamin und methylierte Thiole umfasst (Finster *et al.* 1992; Boone *et al.* 1993; Van der Maarel *et al.* 1995). Abhängig vom Methyl donor kommen unterschiedliche Methyltransferasen zum Einsatz. Bei den meisten Untersuchungen des Enzymsystems der Methanogenese diente *M. barkeri* als Modellorganismus, dessen Genom zu 95 % mit dem von *M. mazei* übereinstimmt (Maeder *et al.* 2006). Ausgehend vom Methanol wird die Methylgruppe von der Methyltransferase MtaB auf das Corrinoid-bindende Protein MtaC und von dort von der Methyltransferase MtaA auf CoM übertragen (Sauer *et al.* 1997a; Sauer *et al.* 1999). Auch Methylamine können als Substrat genutzt werden (Weimer *et al.* 1978; Hippe *et al.* 1979; Walther *et al.* 1981; Fahlbusch *et al.* 1983). Ausgehend vom Mono-, Di- bzw. Trimethylamin überträgt die MtmB (MtbB beziehungsweise MttB) die Methylgruppe auf das Corrinoid-bindende Protein MtmC (MtbC bzw. MttC) und die MtbA<sub>1-3</sub> (oder ausgehend vom Trimethylamin auch die MtaA<sub>1-2</sub>) überträgt die Methylgruppe von dort auf CoM (Burke *et al.* 1995; LeClerc *et al.* 1996; Burke *et al.* 1997; Sauer *et al.* 1997a; Burke *et al.* 1998; Ferguson *et al.* 2000). In allen drei Fällen kann die MtbA den Transfer der Methylgruppe auf CoM katalysieren. Es konnte gezeigt werden, dass die MtbA von *M. barkeri*, die zu 87 % mit der MtbA von *M. mazei* homolog ist, auch freies MeCob als Methylgruppendonator für die CoM-Methylierung nutzen kann (Ferguson *et al.* 1996).

Eine Ausnahme bildet das Enzymsystem, dass CoM ausgehend vom Dimethylsulfid methyliert: Es gibt in diesem Fall nur eine Methyltransferase (MtsA) die sowohl den Transfer der Methylgruppe vom Substrat auf das Corrinoid-bindende Protein MtsB (oder freies Cob(I)alamin) katalysiert als auch den Methyltransfer vom Corrinoid auf CoM (Tallant *et al.* 2001).

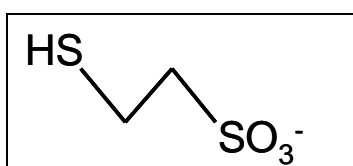
Im Genom von *M. mazei* liegen 85 Gene vor, die für putative Methyltransferasen kodieren. 22 dieser Gene kodieren für putative Corrinoid-abhängige Methyltransferasen, von denen sechs für CoM-abhängige Methyltransferasen der Methanogenese kodieren (orf MM 0505, 1439 und 1932 für MtbA<sub>1-3</sub>, MM 0176 und 1070 für MtaA<sub>1+2</sub> und MM 2438 für MtsA (Hovey *et al.* 2005).



**Abb. 2** Schema der Methylgruppenübertragung von Mono-, Di- oder Trimethylamin

#### Methylierung von Coenzym M

Um den Methylthioether  $\text{CH}_3\text{CoM}$  zu bilden, wird das Proton der Thiolgruppe des CoM in einer nukleophilen Substitutionsreaktion durch die Methylgruppe vom MeCob ersetzt (Sauer *et al.* 1997b; Sauer *et al.* 1999). Dazu ist eine vorherige Aktivierung des CoM nötig. Alle bisher bekannten Enzyme, die die Alkylierung von Thiolen katalysieren, sind Zinkproteine (Matthews *et al.* 1997), zum Beispiel das Adaprotein von *E. coli* (Wilker *et al.* 1997), die Cobalamin-abhängige Methionin Synthase MetH (Peariso *et al.* 1998) und MetE (Zhou *et al.* 1999) von *E. coli*, die humane Betain-Homocystein-Methyltransferase (Brekse *et al.* 1999), die S-Methyl-Methionin-Homocystein-Methyltransferase (Thanbichler *et al.* 1999) von *E. coli* und Epoxyalkan-Coenzym M-Transferase (Allen *et al.* 1999) von *Xanthobacter strain Py2*.

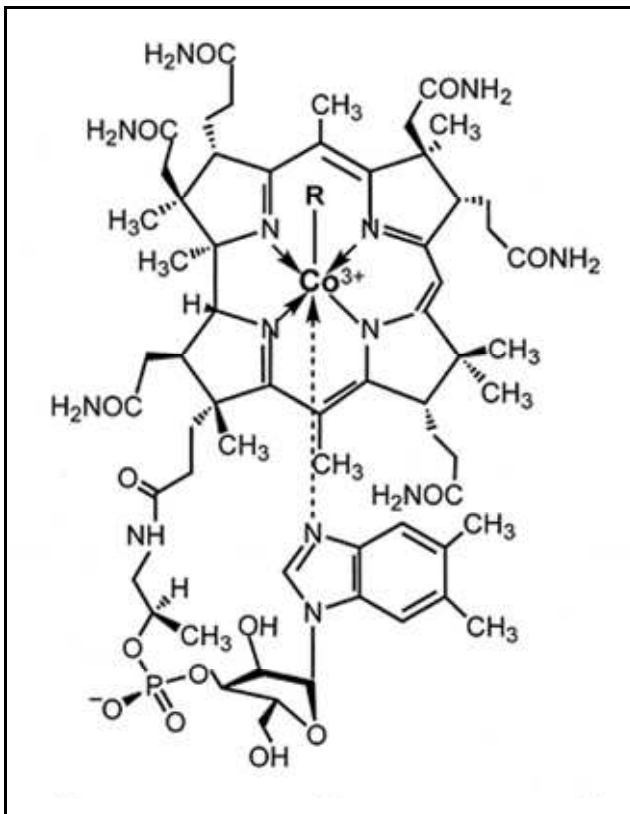


**Abb. 3** Coenzym M

Die vermutete Funktion des  $\text{Zn}^{2+}$  all dieser Proteine ist die einer Lewis-Säure, die die Thiolgruppe aktiviert. Obwohl die MtbA keine Sequenzhomologie zu einem der anderen Zinkproteine aufweist (Harms *et al.* 1996; LeClerc *et al.* 1996), findet sich das Zinkbindungsmotiv  $\text{HXCX}_n\text{C}$  der MetE in ihrer Sequenz (Zhou *et al.* 1999), sodass es wahrscheinlich ist, dass die Thiolgruppe des CoM auf die gleiche Weise aktiviert wird wie bei den anderen Zinkproteinen (Sauer *et al.* 2000).

### Methylcobalamin

Die Methylgruppe des Corrinoid-Proteins wird durch einen nukleophilen Angriff des enzymgebundenen Thiolats heterolytisch abgespalten, wobei Cob(I) entsteht (Hogenkamp *et al.* 1985; LeClerc *et al.* 1996). *In vitro* konnte auch die Bildung von Cob(II) beobachtet werden. Es wird angenommen, dass die Entstehung von Cob(II) auf die Oxidation des Cob(I) durch Disulfide in der CoM-Präparation zurückzuführen ist, da die Menge des inaktiven Cob(II) mit steigender Thiol-Konzentration zunimmt (Hogenkamp *et al.* 1985; LeClerc *et al.* 1996).



**Abb. 4** Cobalamin (Methylcobalamin: R =  $-\text{CH}_3$ , Coenzym B12 (= AdoCob): R = 5'-Desoxyadenosyl, Cyanocobalamin (= Vitamin B<sub>12</sub>): R =  $-\text{CN}$ , Hydroxycobalamin (= Vitamin B<sub>12a</sub>): R =  $-\text{OH}$  (Banerjee *et al.* 2003)

Methylcobalamin gilt bei einer Vielzahl biologischer Methylierungsprozesse als einer der wichtigsten Methylgruppendonoren. Die Methylgruppe kann als Radikal ( $\text{CH}_3^\bullet$ ),

Carboniumion ( $\text{CH}_3^+$ ) oder Carbanion ( $\text{CH}_3^-$ ) transferiert werden (Ridley *et al.* 1977). Der Methyltransfer kann entweder enzymatisch oder nichtenzymatisch erfolgen. So reagiert  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  mit verschiedenen Metall(oid)en nicht-enzymatisch durch Übertragung des Carbanions zu den entsprechenden Alkylmetall(oid)en und Aquo- $\text{B}_{12}$  (Wood *et al.* 1978). Diese nicht-enzymatische Methylierung in Gegenwart von Methylcobalamin konnte für eine Reihe von Elementen (As, Bi, Ge, Hg, I, Pb, Se, Sn, Te, Tl) gezeigt werden (Craig 1986; Michalke 1999).

### Ziel dieser Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit sollen Einblicke in die molekularen Mechanismen der Bismut-Methylierung ermöglicht werden.

Im 1. Teil dieser Arbeit sollte die Rolle der intestinalen Mikrobiota von Säugetieren bei der Entstehung flüchtiger methylierter Bismutderivate untersucht werden. Die Auswirkungen der mikrobiellen Biomethylierung sollen am Beispiel ‚Maus‘ untersucht werden, um die biologische Relevanz mikrobieller Metall(oid)methylierungsprozesse abschätzen zu können. Damit wird ein möglicher Zusammenhang zwischen der Entstehung dieser flüchtigen Spezies und der Ablagerung von Bismut in den Organen gezeigt. Dazu sollen Fütterungsexperimente mit Bismut-angereichertem Futter an konventionell gezogenen und keimfreien Mäusen durchgeführt werden. Anschließend soll die Bildung flüchtiger Bismutderivate durch Gasphasenanalysen von Blutproben sowie die Verteilung und Einlagerung von anorganischem Bismut in den Organen untersucht werden. Bismut wurde stellvertretend für andere Metall(oid)e verwendet, da es weniger toxisch und so besser geeignet ist, um tierschonende Langzeitstudien durchzuführen.

Im 2. Teil liegt der Fokus auf der Aufklärung der Mechanismen der enzymkatalysierten Biomethylierung. Dazu soll ein *in vitro*-Bismut-Methylierungs-Assay etabliert werden, mit dem die biotischen und abiotischen Voraussetzungen für die Genese von flüchtigen Bismutderivaten untersucht werden können. Parallel soll eine methylierungsaktive Proteinfraction aus zellfreiem Extrakt von *M. mazei* angereichert und auf ihre Methylierungsaktivität getestet werden. Außerdem soll die mutmaßlich Bismut-methylierungsaktive Methylcobalamin-Coenzym-M-Methyltransferase MtbA von *M. mazei* heterolog exprimiert und gereinigt werden, um sie mittels des *in vitro*-Assays zu charakterisieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Herkunft von Chemikalien

Acrylamid	Serva GmbH, Heidelberg
Agarose NEED	ROTH GmbH, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase (Calf intestinal phosphatase ; CIAP)	MBI Fermentas, St. Leon Rot; New England Biolabs, Frankfurt
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Antifoam 204	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bismut-Ammonium-Citrat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bradford-Reagenz (Protein Assay)	BioRad, München
BSA Standard II (Rinderserumalbumin)	BioRad, München
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Coenzym M	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Coomassie-Brilliant-Blue R	Serva GmbH, Heidelberg
Cystein	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
De-Noltab <sup>®</sup>	Yamonouchi Pharma Ltd. UK
De-Noltab <sup>®</sup> containing mice chow (SNIFF V1534Bi, 10 mm + 180 mg/kg DeNol <sup>®</sup> ):	SNIFF, Soest
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
DNS-Längenstandard (GeneRuler DNA Ladder Mix)	MBI Fermentas, St. Leon Rot; New England Biolabs, Frankfurt
DNS-Ladepuffer 6X Loading Dye Solution	MBI Fermentas, St. Leon Rot; New England Biolabs, Frankfurt
DNAzol Reagenz	Life Technologies, Karlsruhe
Dialyseschläuche	Medicell International, London (UK)
Flüssiger Stickstoff	Messer-Griesheim, Frankfurt
Gase für ICP-MS (Ar, He) und Gase für Nährmedien (N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ):	Messer-Griesheim, Frankfurt
Gelextraktions-Kit (QIAquick)	Qiagen, Hilden
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Hepes	ROTH GmbH, Karlsruhe

Hydroxylapatit High resolution	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Isopropyl- $\beta$ -Thiogalactopyranosid (IPTG)	Gerbu Handelgesell, Gaiberg
Ketamin	Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf
DNS Loading Dye	eigenen Herstellung
Methyl-(III)cobalamin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Methyl-Coenzym M	eigene Herstellung nach Gunsalus et al. (Gunsalus et al. 1978a)
Mikro-Dismembrator S	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva GmbH, Heidelberg
Natriumtetraethylborat (1 % (w/w) (stabilisiert mit 2 % (w/w) KOH-Lösung)	Galba, Geesthacht
Ni-NTA Matrix	Qiagen, Hilden
Oligonukleotide	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Molekulargewichtsstandard (PageRuler™ Unstained Protein Ladder)	MBI Fermentas, St. Leon Rot; New England Biolabs, Frankfurt
pET-Vektor-Systeme	Novagen, Bioggio-Lugano (CH)
<i>pfu</i> -DNA-Polymerase und Puffer	MBI Fermentas, St. Leon Rot; New England Biolabs, Frankfurt
Plasmidpräparations-Kit	Fermentas GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit
Q-Sepharose Matrix	GE Healthcare, München
Restriktionsenzyme BspH1, Xho1, Nco1	MBI Fermentas, St. Leon Rot; New England Biolabs, Frankfurt
Size-exclusion HiLoad 26/60 Superdex 200	GE Healthcare, München
Standardlösungen für ICP-MS	Kraft, Duisburg
Säulenmaterial Gaschromatografie 10 % SP™ – 2100 on 80/100 Supelcoport™	Supelco, Bellefonte, PA (USA)
Sybr green	Fermentas
T4-DNS-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon Rot; New England Biolabs, Frankfurt
<i>taq</i> -DNA-Polymerase und Puffer	PEQLAB Biotechnologie GMBH
tertiäres Butanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Xylazin	Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von Fluka (Seelze), Gerbu (Gaiberg), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roth GmbH (Karlsruhe) oder VWR International (Darmstadt) bezogen. Alle Chemikalien wiesen, soweit nicht anders angegeben, p. a. Qualität auf.



### 2.1.2 Geräte

ABIStep-One Plus cyclor (mit StepOne Software v 2.1)	Applied Biosystems, Darmstadt
Anaerobenkammer	Coy Lab. Inc., Vertrieb Töpfer GmbH, Göppingen
Dampfsterilisatoren	Zirbus LVSA 40/60, Zirbus technology, Bad Grund
Flocken-Eisbereiter	Scotsman AF100, Enodis Deutschland GmbH, Herborn
Dialyseschläuche Visking Ausschlussgrenze 14 kDa	Medicell International, London (UK)
Gasraumglasgefäße	CS-Chromatografie Service GmbH, Langerwehe
Gel-Dokumentations-Gerät	ChemiDoc, BioRad Laboratories GmbH, München Auswertungssoftware Quantity One 4.2.1, BioRad
Hochdruckpresse	French Press, SLM Aminco Instruments Inc., Vertrieb Fa. Polytech, Heilbronn
HPIC-Anlage IC DX-500 (mit Eluentenkabinett E01, Gradientenpumpe GP40 elektrochemischer Detektor ED40, UV/VIS-Detektor VDM2, Anionen- Suppressor ASRS Ultra, Quantifizierung durch PeakNet® 6.2 Säulen: IonPac AS-11 Analytical und IonPac AG11 Guard Column	Dionex GmbH, Idstein
ICP-MS	PlasmaQuad II, Fisions VG, Wiesbaden
Membranfiltration Vivaspin Ausschlussgrenze 10 kDa	Sartorius AG, Göttingen
Mirkrodismembrator S	Sartorius AG, Göttingen
Mikroskope	Olympus BH-2 RFCA, Olympus, Hamburg Olympus CHT, Olympus, Hamburg
Mikrowellensystem MARS 5	CEM GmbH, Kamp-Lintfort
pH-Meter	WTW pH 197, WTW GmbH, Weilheim
Fotometer	Eppendorf BioFotometer, Eppendorf AG, Hamburg

	<p>Genesys 20, Thermo Spectronics, Rochester, NY, USA</p> <p>UV/VIS Spektralfotometer Specord 200 mit der Software WinASPECT<sup>®</sup>, Analytik Jena AG, Jena</p>
Purge-and-trap GasChromatografie (PT-GC)	Eigenbau
Reinstwasseranlage	Seralpur pro 90 CN, Elga-Seral, Ransbach-Baumbach
Rotameter	Supelco, Bellefonte, PA (USA)
Spannungsgeber	<p>Consort E835, Owl Separation Systems, Portsmouth, USA</p> <p>Macrodrive 5, LKB Bromma, Schweden</p>
Thermo Cycler	Eppendorf Mastercycler personal, Eppendorf AG, Hamburg
Vakuum-Zentrifuge	Speed Vac Concentrator, Savant, Farmingdale, GB
Zentrifugen	<p>Avanti J-25, Beckmann, München</p> <p>Biofuge pico, Heraeus Holding GmbH, Hanau</p> <p>Universal 32R, Hettich GmbH &amp; Co KG, Tuttlingen</p> <p>Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg</p> <p>Sigma 3K 12, Braun AG, Melsungen</p>

### 2.1.3 Organismen

#### Archaea

*Methanosarcina mazei* Göl; DSM 3647 (Barker 1936; Mah et al. 1984)

#### Bacteria

*Escherichia coli* K12 Stamm DH5α DSM 6897 (Hanahan et al. 1983)  
(für Klonierung, Lagerung, Plasmidpreparation)

*Escherichia coli* Rosetta (DE3); Novagen  
(für heterologe Expression)

*Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079

#### Mammalia

Konventionelle Mäuse (KONV):

*Mus musculus* B6 (Universitätsklinikum Essen, zentrales Tierlabor)

Keimfreie Mäuse (KF):

*Mus musculus* B6 (Universität Ulm, Tierforschungszentrum)

## 2.1.4 Plasmide

Tab. 1 Verwendete Plasmide

Vektor	Größe (bp)	Resistenz-marker	Verwendung	Eigenschaften	Herkunft
<i>pET15b</i>	5708	Amp	Proteinexpression	T7 <i>lac</i> -Promotor IPTG-Induktion	Novagen Bioggio- Lugano (CH)
<i>pRIL</i>		Camp	Expression von tRNS Genen		Stratagene, La Jolla (USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anzucht von Mikroorganismen

#### 2.2.1.1 Anzucht von *Methanosarcina mazei* Gö 1

Die Kultivierung des methanogenen Archaeums *M. mazei* erfolgte in 2 l Schottflaschen mit 1 l Flüssigmedium anaerob bei 37 °C unter N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Atmosphäre (200 kPa, 80/20 % (v/v)). Das Medium bestand aus folgenden Lösungen:

##### Lösung A:

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,348 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,227 g, NH<sub>4</sub>Cl 0,5 g, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,5 g, CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 0,25 g, NaCl 2,25 g, FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,002 g, NaHCO<sub>2</sub> 0,85 g, Hefeextrakt 2 g, Casiton 2 g, Vitaminlösung (s.u.) 10 ml, Spurenelementlösung SL-10 (s.u.) 1 ml, Hefe-Extrakt 2 g, Casiton 2 g, Resazurin 0,001 g, A. bidest. auf 1000 ml.

##### Spurenelementlösung:

HCl (25 %; 7,7 M) 10 ml, FeCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 1,50 g, ZnCl<sub>2</sub> 70 mg, MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 100 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6 mg, CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 190 mg, CuCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 2 mg, NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 24 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 36 mg, A. bidest. auf 1000 ml.

##### Vitaminlösung:

Biotin 2 mg, Folinsäure 2 mg, Pyridoxin-HCl 10 mg, Thiamin-HCl x 2 H<sub>2</sub>O 5 mg, Riboflavin 5 mg, Nicotinsäure 5 mg, D-Ca-Pantothenat 5 mg, Vitamin B12 0,1 mg, p-Aminobenzoesäure 5 mg, Liponsäure 5 mg, A. bidest. auf 1000 ml. Die Zellen wurden

in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation (15 min, 10.000 x g, 4 °C) geerntet und bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.1.1.1 Ernte und Lagerung von *Methanosarcina mazei* Gö 1**

Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation (15 min, 10.000 x g, 4 °C) geerntet und bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.1.2 Anzucht von *E. coli* DH5α bzw. *E. coli* Rosetta (DE3)**

Die Kultivierung von *E. coli* DH5α bzw. *E. coli* Rosetta (DE3) erfolgte in Erlenmeyerkolben der erforderlichen Größe mit der entsprechenden Menge Luria Bertani (LB)-Flüssigmedium (Pepton 10 g l<sup>-1</sup>, Hefe 5 g l<sup>-1</sup>, NaCl 10 g l<sup>-1</sup>, pH 7,0) bei 37 °C und 200 Upm im Schüttler. Flüssigkulturen von 3 – 400 ml LB-Medium wurden für Übernachtskulturen und zur Gewinnung von Plasmid-DNS verwendet. Die Kultivierung auf sterilen LB-Agar-Platten (LB Medium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar) bei 37 °C im Brutschrank diente der Selektion, Vereinzelung und Lagerung von Klonen. Zellen mit transformierter rekombinanter DNS wurden durch die Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenzen selektioniert.

Vor dem Animpfen wurden 100 µg/ml Ampicillin (*E. coli* K12 Stamm DH5α mit pET 15b) bzw. 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol (*E. coli* Rosetta (DE3) mit pET 15b und pRIL) zugegeben.

Zur Gewinnung und Anreicherung von rekombinantem Enzym erfolgte die Kultivierung von *E. coli* Rosetta DE3 in 6 l LB-Medium (Inokulum: 1 – 2 % mit einer Übernachtskulturen angeimpft) im Wasserbad bei 37 °C. Die Expressionskultur wurde mit Druckluft begast (50 l min<sup>-1</sup>).

Der Wachstumsverlauf wurde über die optische Dichte bei 600 nm verfolgt und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 erfolgte die Induktion der Expression des rekombinanten Enzyms durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). IPTG dereprimiert den *lacUV5*-Promotor des T7-RNA-Polymerase Gens auf dem pET15b-Vektor des Expressionsstammes und induziert so die Transkription des rekombinanten Gens unter der Kontrolle dieses Promotors.

Zuvor wurden Aliquots der Expressionskultur abgenommen und diese Zellen für eventuelle spätere Expressionen als Glycerinkulturen (10 – 25 % (v/v)) bei -80 °C gelagert. Drei Stunden nach der Induktion wurden die Zellen abzentrifugiert (15 min, 6.000 x g, 4 °C) und bei -80 °C gelagert.

Zur späteren Analyse des heterolog exprimierten Proteins mittels SDS-PAGE wurden Aliquots (1 ml) der Zellkultur vor und nach Induktion mit IPTG abgenommen, zentrifugiert

(5 min, 13.000 x g, 4 °C) und das Pellet mit 80 µl DNase freiem A. bidest. und 20 µl Laemmli-Puffer (120 mM Tris/HCl, pH 6,8, 20 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 4 % (v/v) Natrium-dodecylsulfat (SDS) und 0,1 % (w/v) Bromphenolblau resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Klone wurden als Glycerinkulturen (10-25 % (v/v)) bei -80 °C gelagert.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Isolierung genomischer DNS aus *M. mazei*

Für die Isolierung genomischer DNS aus *M. mazei* wurden 1 – 2 g Zellen in 4 ml DNAzol Reagenz resuspendiert und mittels eines Potters aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (1 min, 20.000 x g, 4 °C) wurde der Überstand dekantiert und mit 1 ml 100-prozentigem Ethanol gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Die ausgefällte DNS wurde mit einer Pipettenspitze aufgewickelt und in einem neuen Gefäß mit dreimalig 70-prozentigem EtOH gewaschen, zentrifugiert (5 min, 20.000 x g, 4 °C) und das EtOH anschließend vorsichtig dekantiert. Danach wurde die DNS in 1,5 ml DNase-freiem A. bidest. aufgenommen und zur Verbesserung der Löslichkeit mit 10 mM NaOH versetzt. Um sie von EtOH-Resten zu befreien, wurde die DNS 30 min in der Speed Vac konzentriert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### 2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNS (pET15b) aus *E. coli* DH5α

Die Plasmid-DNS (pET15b) wurde mit Hilfe des Fermentas GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits aus 3 – 5 ml *E. coli* DH5α Übernachtskultur nach Protokoll des Herstellers isoliert. Nach Zellaufschluss mit einer NaOH/SDS-Lösung wurde durch Zugabe von Na- bzw. K-Acetat erreicht, dass chromosomale DNA und Proteine einen Komplex mit SDS und Kalium- bzw. Natriumionen bildeten und zum größten Teil an den Zelltrümmern gebunden blieben, während die Plasmide in Lösung blieben und unter Hochsalzbedingungen an hydrophobe Interaktions-Chromatographiesäulen gebunden werden konnten. Nach Elution mit Niedrigsalzpuffer oder A. bidest. wurde die Plasmid-DNS bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2.3 Quantitative und qualitative Analyse von DNS

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte fotometrisch bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine OD<sub>260</sub> von 1 einer Konzentration von 50 µg dsDNS / ml (Sambrook *et al.* 1989).

Das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt Auskunft über die Kontamination der präparierten DNS mit Proteinen. Ist dieses Verhältnis  $\geq 1,8$  liegt nur eine sehr geringe Verunreinigung mit Proteinen vor.

#### 2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNS

Die Auftrennung von DNS mittels Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook 1989) dient der Mengen- und Größenabschätzung von PCR-Produkten und der präparativen Gewinnung von DNS-Fragmenten.

Die benötigten Agarosekonzentrationen sind abhängig von der Fragmentgröße der aufzutrennenden DNS (0,8 % für Fragmente  $> 7$  kb und 2,5 % für Fragmente  $< 7$  kb), in diesem Fall wurden 2,5 % (w/v) Agarose in TAE (40 mM Tris/HCl, 5 mM Na-Acetat, 1mM EDTA, pH 8,0) verwendet. Die mit Probenpuffer (8 Vol % Saccharose, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol FF) versetzten DNS-Proben wurden auf das Agarosegel aufgetragen und eine konstante Spannung von 60 V angelegt, wodurch die negativ geladenen DNS-Fragmente zur Kathode wandern und sich dabei nach ihrer Größe im Gel auftrennen. Dabei ist die Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Als Standard wurde ein Molekulargewichtsmarker (Gene Ruler DNA Ladder Mix) parallel aufgetragen. Im Anschluss wurde das Gel 15 Minuten in einem Ethidiumbromidbad ( $2 \text{ mg l}^{-1}$  Ethidiumbromid ((v / v) in A. bidest.) inkubiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die DNS, sodass diese im Gel bei Anregung mit UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) sichtbar wird. Zur Dokumentation der Gele diente das ChemiDoc-System (BioRad Laboratories GmbH, München).

Zur DNS-Extraktion wurden die entsprechenden Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

#### 2.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

##### Standard-PCR mit genomischer DNS als Template

Nukleotidsequenzen können *in vitro* mittels der PCR enzymatisch exponentiell amplifiziert werden (Mullis *et al.* 1986). Für die PCR werden eine dsDNS-Vorlage (Template) und zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) benötigt, deren Sequenzen komplementär zum 5'-Ende bzw. revers komplementär zum 3'-Ende des Templates sind. Diese Primer dienen einer thermostabilen DNS-Polymerase (z. B. *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* bzw. *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* mit 3'-5' Exonucleaseaktivität (proofreading)) als Startpunkt für die DNS-Synthese (Saiki *et al.* 1988). Die PCR ist in drei Schritte gegliedert:

1. Denaturierung einer dsDNS-Vorlage bei 94°C
  2. Annealing der Template-DNS und den Primern bei einer von der Länge und Basenzusammensetzung der Primer-abhängigen Temperatur
  3. DNS-Polymerisation bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Polymerasen
- Die Annealingtemperatur wurde nach folgender Formel berechnet (gilt für Oligonukleotide  $\leq 20$  Nukleotide):

$$T_A = (A/T) \times 2 + (G/C) \times 4 \quad (\text{Thein 1986})$$

mit:

$T_A$  Annealingtemperatur,

A, T, G, C Anzahl der Nukleotide.

Für PCR-Amplifikationen wurden 50 ng Template-DNS, 25 pmol jedes Primers, 5 pmol dNTPs, 25 pmol  $\text{MgCl}_2$ , 4 % (v / v) DMSO (Dimethylsulfoxid) und 1 U Polymerase (*Taq* oder *Pfu*) im entsprechenden Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 25  $\mu\text{l}$  in A. bidest. eingesetzt. Nach einem ersten Denaturierungsschritt (2 min, 94 °C) folgten 30 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Annealing bei der Primer-spezifischen Annealingtemperatur (hier 59 °C) und 1,5 min Elongation bei 72 °C (1 min pro 1.000 bp). Zum Schluss folgte eine 10-minütige Inkubation bei 72 °C zur Vervollständigung von Teilsequenzen.

### PCR-Mutagenese

Zur Klonierung des Gens in den Vektor pET 15b wurden mittels der Primer hinter dem Start- bzw. Stopcodon der codierenden Sequenz Restriktionsschnittstellen eingeführt.



Nukleotidsequenz der MtbA orf 1439 von M. mazei

ATGACAGAATATACACCAAAAGAAAGATTATACCGTGCACCTTAGAAAACAGCCAGTGGACAGAATGCCTG  
 CTGTTTGTTCACACAGACCGGAACCGTCGAACAGATGGAAGCCTCAGGAGCCTTCTGGCCTGAAGCCCA  
 TGCGGACGCAGAGAAAAATGGCAAACTTGCAGGAACTGGACATACAGTAATTGGTTTTGAGGCAGTAAGG  
 GTTCCTTTTGACATTACGGCTGAAGCAGAACTTTTGGCTGCGGGATAAAGGCTGGCGACCTGAAGCAGC  
 AGCCGTCTGTTATAAAGCACAGCGTAAAGAACCTCGAAGATCTGGATAAGATCAAAAATTACAGCCTGGA  
 TACAGGCAGAATAGGCACAATCCTGAAAGCTGTAAAGATCCTTTCAGAAAAGTATGGAAAAGAACTTCCT  
 GTTATCGGGTCCATGATAGGTCCTTTCTCCCTTGCCCAGCACATCAACGGAGATGCCTGGTTTGGAAACC  
 TTTTCACAGGCGAGGACATTGTCCCTGCACCTTCTGGACTTCTGCGCAGACTTCAACATAGCATATGCAAA  
 AGCAATGGTTGAGAACGGAGCAGACACAATAGCCATTATCGACCCACAGCAAGCTATGAGCTCATCGGC  
 GGGGAGTTCTATGAGAAATATGCCCTTCCCTACCAGAAAAAGATCGTTGACGCCATGAAGGAGCTCGATG  
 TCGCTACAGTCCCTCCATATCTGCGGAAACACAACCAATGGCCTTGCAATTATGGACAGGACAGGAGTAAA  
 TGCTATCAGTGTGGACCAGAGAGTGGATATCAAGACCGCAACAGGCAATGTGGAAAATGCTATTATCGTC  
 GGAAACCTCGACCTGTAGCCGTACTCTGGAATGGAACCTCTGAGGATGTTGAGGCAGCCTCAAAGAAGG  
 TGCTCGATGCAGGTGTCGGAATACTTACAGTTGGTTGCGGGATTGTAAGCATGACACCCAGTGCCAACCT  
 TCAGAAAATGGTTGAGTGCCTAAAAATTACAGGTACTGA

**Tab. 2** Sequenzen der verwendeten Primer (Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind fett, mutierte Nukleotide kursiv markiert)

	Sequenz
<b>forward Primer</b>	AGAGAGGGATGATT <b>CATG</b> ACAGAATA Schnittstelle BspH1, Vektor mit Nco1 (C CATGG) geschnitten; erzeugen kompatible, cohesive Enden
<b>reverse Primer</b>	ATTACAGGTACT <b>GAG</b> AGACGTACC <b>TGGAGATA</b> Schnittstelle Xho1

Boiling-PCR

Diese Methode dient dem schnellen Screening rekombinanter Klone, die möglicherweise das gewünschte DNS-Fragment enthalten. Die Klone wurden auf eine neue Agarplatte überimpft und weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. Einige Zellen dieser Klone wurden in 50 µl Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,0) suspendiert, zum Aufschluss 5 min bei 94 °C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (1 min, 13.000 x g, RT). Die DNS im Überstand wurde als Template (5 µl) in eine PCR mit sequenzspezifischen Primern eingesetzt. Positive Klone konnten anhand der erwarteten Größe des PCR-Produktes (1.020 bp) im Agarosegel identifiziert werden.

### 2.2.2.6 Reinigung von DNS-Fragmenten

#### Extraktion von DNS aus TAE-Agarosegelen

Zur präparativen Gewinnung von DNS aus TAE-Agarosegelen wurde das Gelextraktions-Kit QIAquick nach Protokoll des Herstellers verwendet.

Dabei wurde die DNS durch 10-minütige Erwärmung bei 50°C aus der Agarose gelöst, unter Hochsalzbedingungen an eine Kieselgel-Matrix gebunden und gereinigt. Unter Niedrigsalzbedingungen wurde sie anschließend in ein adäquates Volumen TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) eluiert.

#### Reinigung von PCR-Produkten

Für die Reinigung und Konzentrierung von PCR-Produkten wurde das PCR Purification-Kit QIAquick nach Protokoll des Herstellers verwendet.

Hierzu wurden bis zu 10 µg DNS auf eine Säule geladen, gewaschen und in 40 µl TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) oder steriles A. bidest. eluiert. In allen Fällen wurde das im Spülpuffer vorhandene Ethanol unter Vakuum in der Speed Vac Vakuum-Zentrifuge entfernt.

### 2.2.2.7 Restriktion

Zur Restriktion genomischer DNS, Plasmid-DNS oder PCR-Produkten wurden 2,3 U µg<sup>-1</sup> DNS der jeweiligen Restriktionsenzyme (BspH1 bzw. Nco1 und Xho1) im entsprechenden Puffer (Endvolumen 20 µl) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 U alkalischer Phosphatase (dephosphoriert die kompatiblen Enden um eine Religation des Plasmids bei der Ligation zu verhindern) wurde der Restriktionsansatz nochmals 1 h inkubiert.

Nachfolgend wurden sowohl das restringierte Plasmid als auch das restringierte PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt (siehe 2.2.2.6), um die Restriktionsendonucleasen zu entfernen.

### 2.2.2.8 Ligation

Für die Ligation restringierter DNS-Fragmente mit einem Vektor wurde die T4-DNS-Ligase aus *E. coli* verwendet, welche die kovalente Verknüpfung von 3'-Hydroxy- mit 5'-Phosphat-Enden von dsDNS-Molekülen unter ATP-Verbrauch katalysiert.

Äquimolare Mengen Vektor- und Insert-DNS wurden im Verhältnis 1:3 in einem Gesamtvolumen von 16 µl in A. bidest. eingesetzt. Um eventuell gebildete Sekundärstrukturen aufzulösen, erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 45 °C. Anschließend wurden je 2 µl T4-DNS-Ligase und Ligasepuffer zugegeben (Endvolumen

20 µl) und der Ligationsansatz über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Reaktion wurde am Morgen durch eine 10-minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt und bis zur Transformation bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.2.9 Herstellung kompetenter Zellen**

Für die Präparation kompetenter Zellen wurden 25 ml steriles LB-Medium mit 250 µl einer *E. coli* (DH5α oder Rosetta) Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 200 Upm im Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 – 0,5 inkubiert und dann abzentrifugiert (10 min, 1.370 x g, 4 °C). Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden in 10 ml Lösung A (10 mM MOPS und 10 mM RbCl, pH 7,0) aufgenommen, erneut abzentrifugiert (10 min, 2.300 x g, 4 °C), das Pellet in 10 ml Lösung B (100 mM MOPS, 50 mM CaCl<sub>2</sub> und 10 mM RbCl, pH 6,5) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation (5 min, 700 x g, 4 °C) wurden die pelletierten Zellen in 2 ml Lösung B aufgenommen. Je 150 µl der Zellsuspension wurden vorsichtig mit 150 µl 50-prozentigem (v/v), sterilem Glycerin gemischt und die Glycerinkulturen bis zur Transformation bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.2.10 Transformation von *E. coli***

Für die Transformation wurden 200 µl kompetente *E. coli*-Zellen (K12 Stamm DH5α bzw. Rosetta (DE3)) mit 20 µl rekombinantem Plasmid gemischt und mindestens 60 min auf Eis inkubiert. Zur Kontrolle wurden 4 µl Plasmid ohne Insert mit weiteren 200 µl kompetenter Zellen inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 sec. bei 42 °C (um poröse Zellen zu schließen) und anschließender 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden 800 µl steriles LB-Medium zum Transformationsansatz hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Um transformierte Klone zu selektieren, wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agar-Platten ausplattiert, die die entsprechenden Antibiotika enthielten (Ampicillin für K12 Stamm DH5α; Ampicillin und Chloramphenicol für Rosetta (DE3)) und 12 h bei 37 °C inkubiert. Die Plasmide der erhaltenen Klone wurden isoliert (siehe 2.2.2.2), einer Restriktionsanalyse unterzogen und anschließend sequenziert.

#### **2.2.2.11 Sequenzierung von DNS**

DNS-Sequenzierungen (Sanger *et al.* 1992) wurden von der Firma Agowa GmbH, Berlin durchgeführt. Es wurden die Sequenz-spezifischen Primer verwendet. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm CHROMAS (McCarthy 1996) in Form von Chromatogrammen

visualisiert um die Richtigkeit der bestimmten Basenabfolge zu kontrollieren und mit Hilfe des Programms BLAST 2.0 (Altschul et al. 1998) die Übereinstimmung mit der klonierten Nukleotidsequenz überprüft.

### 2.2.3 Biochemische Methoden

#### 2.2.3.1 Anreicherung von Proteinfractionen des zellfreien Extraktes von *M. mazei* mit Bismut-spezifischer Methylierungsaktivität

##### Zellaufschluss

Der Aufschluss der in der stationären Phase geernteten *M. mazei*-Zellen (hier: 10 g) erfolgte in 5 ml Aufschlusspuffer pro Gramm gefrorener Zellen. Als Aufschlusspuffer wurde jeweils der Puffer verwendet, der als Laufpuffer für die anschließende Chromatografie diente. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellsuspension wurde durch dreimalige Passage durch die Hochdruckpresse (French Press) bei 80 bar aufgeschlossen und die Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert (30 min, 20.000 x g, 4 °C). Die so erhaltenen Rohextrakte wurden bei 4 °C gelagert.

##### Anionenaustausch-Chromatografie

Der Proteingehalt des zellfreien Extraktes (45 ml) nach Zellaufschluss und Zentrifugation wurde mit der Methode nach Bradford (siehe 2.2.3.3) bestimmt und die Suspension anschließend in geeigneter Konzentration (max. 15 mg Protein ml<sup>-1</sup> Säulenmatrix) auf eine Q-Sepharose-Säule aufgetragen und mit vier Säulenvolumen Laufpuffer gespült. Anschließend wurden die Proteine durch einen NaCl-Gradienten (0 – 1 M NaCl) von der Säule eluiert. Aliquots (10 – 20 µl) der gesammelten Fraktionen wurden mit je 3 µl Laemmli-Puffer versetzt und mittels SDS-Page aufgetrennt. Die Fraktionen wurden einzeln im *in vitro*-Assay auf ihre Fähigkeit zur Bismut-Methylierung getestet (siehe 2.2.4.4). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, mittels Membranfiltration (Vivaspin ≥ 10 kDa) eingengt und über Nacht gegen 2 l 50 mM Hepes, pH 7,0 bei 4 °C dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

Die Q-Sepharose-Chromatografie wurde insgesamt dreimal unter identischen Bedingungen wiederholt und die aktiven Fraktionen wurden jeweils vereinigt.

**Tab. 3 Chromatografie-Protokoll Q-Sepharose**

<b>Säulen- volumen</b>	<b>Lauf- geschwindigkeit</b>	<b>Einlauf</b>	<b>Laufpuffer</b>	<b>Gradient</b>	<b>Fraktionen</b>
40 ml	1,5 ml * (cm <sup>2</sup> * min) <sup>-1</sup>	100 min	50 mM Hepes, pH 7,0	0-1 M NaCl 400 ml	je 7,5 ml

Hydroxylapatit-Chromatografie

Der dialysierte Fraktionspool der drei Q-Sepharose-Chromatografien wurde in geeigneter Konzentration (max. 15 mg ml<sup>-1</sup> Säulenvolumen) mit Hilfe einer Hydroxylapatit-Chromatografie weiter aufgetrennt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen NaCl-Gradienten (0 – 1 M NaCl). Aliquots (10 – 20 µl) der gesammelten Fraktionen wurden mit je 3 µl Laemmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Fraktionen wurden einzeln im *in vitro*-Assay auf ihre Fähigkeit zur Bismut-Methylierung getestet. Die aktiven Fraktionen, die bei gleichen NaCl-Konzentrationen eluierten, wurden vereinigt, mittels Membranfiltration (Vivaspin ≥ 10 kDa) eingeengt und über Nacht gegen 1 l 50 mM Hepes, 300 mM NaCl pH 7,0 bei 4 °C dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

**Tab. 4 Chromatografie-Protokoll Hydroxylapatit**

<b>Säulen- volumen</b>	<b>Lauf- geschwindigkeit</b>	<b>Einlauf</b>	<b>Laufpuffer</b>	<b>Gradient</b>	<b>Fraktionen</b>
32 ml	1,1 ml * (cm <sup>2</sup> * min) <sup>-1</sup>	91 min	50 mM Hepes, pH 7,0	0-1 M NaCl 320 ml	je 7 ml

Größenausschluss-Chromatografie

Die aktiven Fraktionen der beiden Fraktionspools der Hydroxylapatit-Chromatografie wurden nach Einengen und Dialyse gegen den Laufpuffer in zwei getrennten Größenausschluss-Chromatografie-Läufen (Superose 10/300 GL, max. Probenvolumen 240 µl, 5 – 10 mg Protein) weiter angereichert. Aliquots (10 – 20 µl) der gesammelten Fraktionen wurden mit je 3 µl Laemmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten, wurden vereinigt, mittels Membranfiltration auf ≤ 1 ml eingeengt und über Nacht gegen 50 mM Hepes, pH 7,0 dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

Die angereicherten Bismut-methylierungsaktiven Proteine wurden bei 4 °C gelagert.

**Tab. 5**      **Chromatografie-Protokoll Superose 10/300 GL**

<b>Säulenvolumen</b>	<b>Lauf- geschwindigkeit</b>	<b>Laufpuffer</b>	<b>Lauf</b>	<b>Fraktionen</b>
24 ml	$0,5 \text{ ml} \cdot (\text{cm}^2 \cdot \text{min})^{-1}$	50 mM Hepes 300 mM NaCl, pH 7,0	30 ml	je 3 ml

**Eichung der Größenausschluss-Chromatographiesäule Superose 10/300 GL**

Zur Eichung wurde ein Eichlauf mit den Referenzproteinen Ferritin (24 mer, 443 kDa), ADH (Aldehyddehydrogenase, Tetramer, 147 kDa), D-LDH (Laktatdehydrogenase, Dimer 72,6 kDa) und Cyt c (Cytochrom c, Monomer 10,5 kDa) unter denselben Laufbedingungen durchgeführt.

Der Nachweis der jeweiligen Proteine in den Fraktionen erfolgte fotometrisch. Im Falle von Ferritin und Cytochrom c wurde die Absorption des jeweiligen Proteins gemessen (Ferritin 217 nm, Cytochrom c 416 nm). ADH und D-LDH wurden aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität identifiziert: Beide Enzyme katalysieren die Umsetzung ihrer Substrate (ADH: Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol; D-LDH: Reduktion von Pyruvat zu Lactat) über die Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$ . Da NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm spezifisch absorbiert, kann die Aktivität beider Enzyme über die Abnahme der Absorption bei dieser Wellenlänge gemessen werden.

Zur Darstellung der Eichgerade wurde der Logarithmus des Molekulargewichts gegen das Durchflussvolumen des Laufpuffers zum Zeitpunkt der Elution des Proteins aufgetragen. Mittels der Geradengleichung der Ausgleichsgeraden kann man anhand des Zeitpunktes, zu dem ein Protein von der Säule eluiert, das ungefähre Molekulargewicht berechnen.

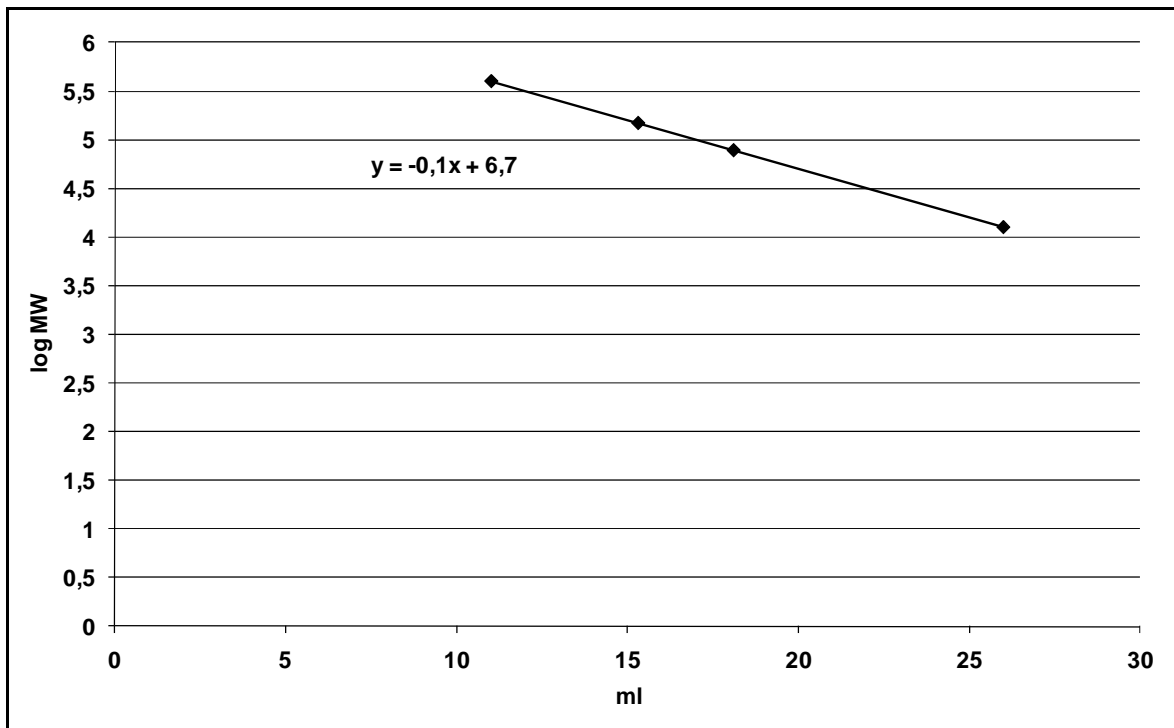


Abb. 5 Eichgerade für Superose 10/300 GL

### 2.2.3.2 Reinigung des heterolog exprimierten Proteins MtbA mit und ohne His-tag

#### Zellaufschluss

Der Aufschluss heterologer *E. coli*-Zellen (hier: 2 g) zur Anreicherung des rekombinanten Enzyms erfolgte in 2 ml Aufschlusspuffer pro Gramm gefrorener Zellen. Als Aufschlusspuffer wurde jeweils der Puffer verwendet, welcher als Laufpuffer für die anschließende Chromatografie diente. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellsuspension wurde durch dreimalige Passage durch die Hochdruckpresse (French Press) bei 80 bar aufgeschlossen und die Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert (30 min, 20.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und bei 4 °C gelagert.

#### Ni-NTA- Metallaffinitätschromatografie zur Reinigung der MtbA mit His-tag

Tab. 6 Chromatografie-Protokoll Ni-NTA

Säulen- volumen	Lauf- geschwindigkeit	Einlauf	Laufpuffer	Gradient	Fraktionen
5 ml	$1,3 \text{ ml} \cdot (\text{cm}^2 \cdot \text{min})^{-1}$	20 min	50 mM Hepes, 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 7,0	10-400 mM Imidazol 50 min	je 2,5 ml

Das heterolog exprimierte Protein mit C-terminalem His-tag wurde mit Hilfe der Ni-NTA-Metallaffinitätschromatografie gereinigt. Dabei sind Nickelionen über NTA an eine stationäre Sepharose-Matrix gekoppelt. Das Prinzip beruht auf der Bindung des His-tag des rekombinanten Proteins an die Nickelionen an der Matrix.

Der Rohextrakt nach Zellaufschluss und Zentrifugation wurde auf eine Ni-NTA-Säule (max. 15 mg Protein pro ml Säulenmatrix) aufgetragen und anschließend mit 4 Säulenvolumen Laufpuffer gespült. Der Laufpuffer enthält 10 mM Imidazol um unspezifische Bindungen von *E. coli*-Proteinen zu minimieren. Anschließend wurde das Protein durch einen Imidazolgradienten (10 – 400 mM Imidazol) von der Säule eluiert. Aliquots (10 – 20 µl) der gesammelten Fraktionen wurden mit je 3 µl Laemmli-Puffer (siehe 2.2.3.4) versetzt und mittels SDS-Page (siehe 2.2.3.4) aufgetrennt. Das rekombinante Protein war als dominante Bande mit einer Größe von 36 kDa zu erkennen. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, mittels Membranfiltration auf ≤ 1 ml eingeeengt und über Nacht gegen 1 l 50 mM Hepes, pH 7,0 bei 4 °C dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt und die Probe bei -20 °C gelagert.

#### Anionenaustausch-Chromatografie

Das heterolog exprimierte Protein ohne His-tag wurde mittels Anionenaustausch-Chromatografie (Q-Sepharose) angereichert. Der Rohextrakt nach Zellaufschluss und Zentrifugation wurde auf eine Q-Sepharose-Säule (max. 15 mg Protein ml<sup>-1</sup> Säulenmatrix) aufgetragen und mit 4 Säulenvolumen Laufpuffer gespült. Anschließend wurde das Protein durch einen NaCl-Gradienten (0 – 1 M NaCl) von der Säule eluiert. Aliquots (10 - 20 µl) der gesammelten Fraktionen wurden mit je 3 µl Laemmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten, wurden vereinigt, mittels Membranfiltration auf ≤ 1 ml eingeeengt und über Nacht gegen 1 l 50 mM Hepes, pH 7,0, 300 mM NaCl bei 4 °C dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

**Tab. 7      Chromatografie-Protokoll Q-Sepharose**

<b>Säulen-volumen</b>	<b>Lauf-geschwindigkeit</b>	<b>Einlauf</b>	<b>Laufpuffer</b>	<b>Gradient</b>	<b>Fraktionen</b>
6 ml	1,3 ml * (cm <sup>2</sup> * min) <sup>-1</sup>	20 min	50 mM Hepes, pH 7,0	0-1 M NaCl 78 ml	je 2,5 ml

#### Größenausschluss-Chromatografie

Die vereinigten Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatografie wurden nach Einengen und Dialyse gegen den Laufpuffer mittels zweimaliger Größenausschluss-Chromatografie

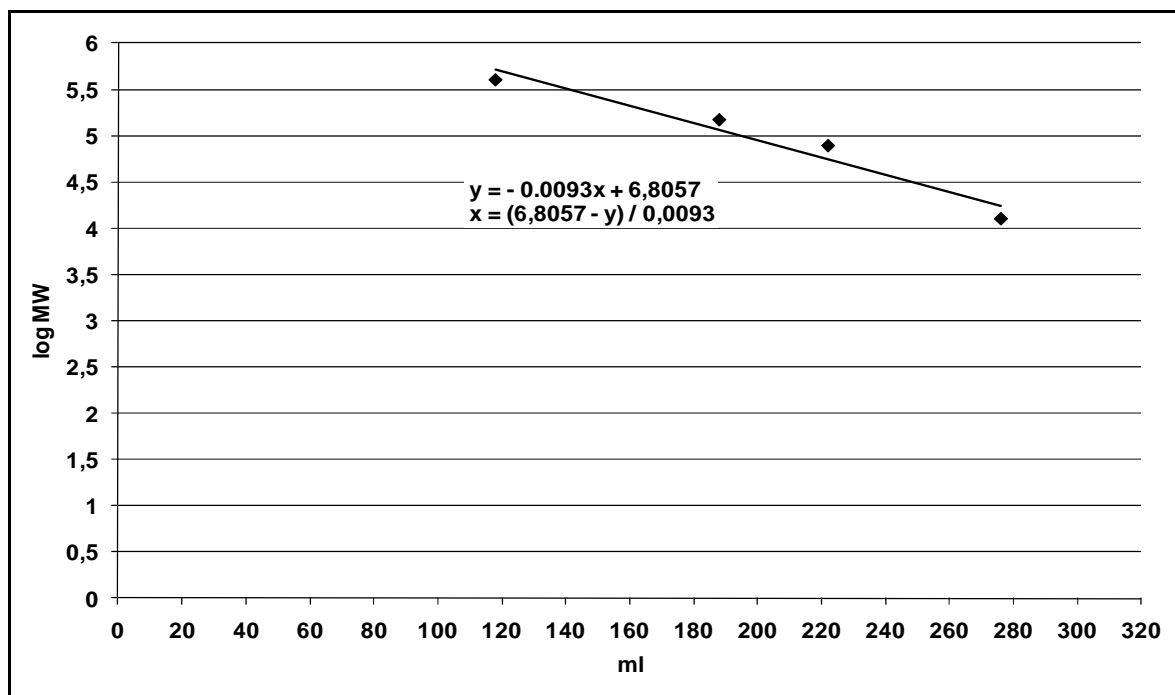


(HiLoad 26/60 Superdex 200, max. Probenvolumen 13 ml) weiter angereichert. Aliquots (10 – 20 µl) der gesammelten Fraktionen wurden mit je 3 µl Laemmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten wurden vereinigt, mittels Membranfiltration auf ≤ 1 ml eingengt und über Nacht gegen 50 mM Hepes, pH 7,0 dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

**Tab. 8**      **Chromatografie-Protokoll HiLoad 26/60 Superdex 200**

<b>Säulen- volumen</b>	<b>Lauf- geschwindigkeit</b>	<b>Laufpuffer</b>	<b>Lauf</b>	<b>Fraktionen</b>
320 ml	$0,4 \text{ ml} \cdot (\text{cm}^2 \cdot \text{min})^{-1}$	50 mM Hepes 300 mM NaCl, pH 7,0	64 ml	je 4 ml

Eichung der Größenausschluss-Chromatographiesäule HiLoad 26/60 Superdex 200



**Abb. 6**      **Eichgerade für HiLoad 26/60 Superdex 200**

### 2.2.3.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte mit Hilfe des BioRad Protein-Assays [modifiziert nach (Bradford 1976)]. Dabei wurden 10, 30, 50 und 70 µl der zu testenden Proteinprobe verdünnt oder unverdünnt eingesetzt und mit A. bidest. auf ein Endvolumen von 800 µl aufgefüllt. Den Ansätzen wurden dann jeweils 200 µl des Protein-Reagens zugegeben, gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Konzentration der Lösungen

wurde über eine Eichkurve bestimmt, die mit BSA (0, 2, 4, 6, und 10 µg/ml) hergestellt wurde.

#### 2.2.3.4 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach (Laemmli 1970)

Bei SDS-PAGE (Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach LAEMMLI erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. SDS denaturiert die Proteine und überdeckt deren Eigenladungen, sodass die Proteine eine uniforme Ladung annehmen. Die verwendeten Gele bestehen aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Das Trenngel (Endkonzentration 10 % (w / v) Polyacrylamid, 375 mM Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 % (v / v) SDS, 0,03 % (v / v) Ammoniumpersulfat (APS), 0,005 % (v / v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)) wird nach dem Auspolymerisieren mit dem Sammelgel ((Endkonzentration 4 % (w / v) Polyacrylamid, 125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,1 % (v / v) SDS, 0,03 % (v / v) Ammoniumpersulfat (APS), 0,005 % (v / v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)) überschichtet. Die SDS-PAGE wurde in einem Laufpuffer (0,25 mM Tris/HCl, 0,19M Glycin, 0,1 % (v / v) SDS) durchgeführt.

Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 3 µl 5 x Probenpuffer (120 mM Tris/HCl, pH 6,8, 20 % (v / v) Glycerin, 10 % (v / v) β-Mercaptoethanol, 4 % (v / v) SDS, 0,1 % (w / v) Bromphenolblau) versetzt und für 3 min bei 94 °C denaturiert. Nach dem Einlaufen der Proben (30 min bei 13 mA) erfolgte die Auftrennung im Trenngel (90 min bei 18 mA).

Im elektrischen Feld wandern die durch die SDS-Einlagerung negativ geladenen Proteine zur Kathode und trennen sich auf ihrem Weg nach ihrer Größe auf, wobei kleine Proteine schneller wandern als große, welche in den Poren der Gelmatrix eher zurückgehalten werden.

Die Detektion erfolgte durch Färben (20 min bei 50 °C) des Gels mit Coomassie-Lösung (40 % (v / v) Methanol, 10 % (v / v) Essigsäure, 0,1 % (w / v) Coomassie-Brilliant-Blue R und anschließender 15-minütiger Entfärbung bei 50 °C (Entfärber: 7,5 % (v / v) Essigsäure, 5 % (v / v) Methanol).

Zur Dokumentation der Gele diente das ChemiDoc-System mit der Auswertungssoftware Quantity one 4.2.1.

Das Molekulargewicht der denaturierten Proteine wurde mittels des parallel aufgetragenen Größenstandards PageRuler™ bestimmt.

### 2.2.3.5 Lagerung des gereinigten rekombinanten Proteins

Ein Teil der Proteinlösung wurde 1:1 mit 50-prozentigem sterilen Glycerin gemischt und aliquotiert bei -20°C gelagert. Die Aliquots wurden nach der Benutzung nicht wieder eingefroren sondern eventuelle Reste verworfen.

Der andere Teil wurde bei 4 °C gelagert.

## 2.2.4 Analytische Methoden

### 2.2.4.1 ICP-MS Analytik

Die Analyse flüchtiger Metall(oid)-Derivate erfolgte elementspezifisch über Massenspektrometrie nach Plasma-Anregung (ICP-MS) in Anlehnung an (Wickenheiser 1998).

#### Massenspektrometer mit Plasma-Anregung (ICP-MS)

Mittels ICP-MS Analytik wurden sowohl flüssige als auch gasförmige Proben auf ihren Metall(oid)-Gehalt untersucht. Die Analyten werden im bis zu 8.000 K heißen Argon-Plasma des ICP-MS, welches durch einen Radiofrequenzgenerator erzeugt wird, atomisiert und ionisiert, sodass die Analyten als Element-Ionen des entsprechenden Metall(oid)s vorliegen. Der Ionenstrom wird im Hochvakuum des Interface fokussiert und dem Quadrupol-MS zugeführt. Die Separation der im Plasma erzeugten Ionen erfolgt im Quadrupolfeld, welches durch vier quadratisch angeordnete Molybdänstäbe mit entgegengesetzt gerichteten Potenzialfeldern und überlagerter Wechselspannung erzeugt wird. Nur Ionen mit definiertem  $m/z$ -Verhältnis bleiben bei gegebener Quadrupolspannung und Frequenz des Wechselfeldes auf einer stabilen Flugbahn, entsprechend der Gleichung:

$$m/z = 1,39 \cdot 10^7 + \frac{U_{\max}}{(f^2 \cdot r_0^2)}$$

mit :

$U_{\max}$  = Quadrupolspannung

$f$  = Frequenz des Quadrupolwechselfeldes

$r_0$  = Abstand zwischen den Quadrupolstäben

$m$  = Masse

$z$  = Ladung

Alle anderen Ionen fliegen ungerichtet durch den Raum und werden nach Entladung an den Quadrupolstäben oder den Umwandlungen über die Hochvakuumpumpen aus dem

System entfernt. Im sogenannten Massensprungmodus werden nur diskrete  $m/z$ -Beträge angewählt, sodass die Impulse pro Isotop und Zeiteinheit detektiert werden. Als Detektor fungiert ein Sekundärelektronenvervielfacher, der den durch Auftreffen der Ionen auf eine Fotokathode erzeugten Strom über ein kontinuierliches Dynodenfeld verstärkt und das Signal der computergesteuerten Datenakquisition bereitstellt. Die Akquisition der Daten erfolgte mittels der vom Gerätehersteller mitgelieferten Software (Plasmlab) im zeitaufgelösten Modus (TRA = Time Resolved Analysis). Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit Microsoft Excel® und Microcal Origin® ausgewertet. Die Betriebsparameter des ICP-MS sind in Tab. 9 zusammengefasst.

**Tab. 9      Betriebsparameter des ICP-MS**

RF-Generator Leistung	1350 W
Auxiliarygas	0,4 l min <sup>-1</sup>
Kühlgas	12 l min <sup>-1</sup>
Zerstäuber (konzentrisch nach Meinhard)	0,8 – 1,3 l min <sup>-1</sup>
Sprühkammer	nach Scott
Zerstäubereffizienz	3 – 5 %
Fluss des <sup>205</sup> Tl-Standards (selbstansaugend)	0,005 – 0,01 ml sec <sup>-1</sup>
Basiswert <sup>205</sup> Tl-Standards 10 ppm	50.000 – 150.000 cps (relative Intensität)

Die Bestimmung der flüchtigen Metall(oid)-Derivate erfolgte durch Detektion des Masse-Ladungsverhältnisses des entsprechenden Metall(oid)s mittels ICP-MS (z. B.  $m/z$  209 Bi). Die Quantifizierung der flüchtigen Metall(oid)-Derivate erfolgte durch externe Interelement-Kalibrierung zum Signal einer <sup>205</sup>Tl-Standardlösung (10 ppm) in 1 % Salpetersäure, indem die Intensität der im ICP-MS detektierten Analyt-Ionen auf die Intensität der <sup>205</sup>Tl-Standardlösung bezogen wurde (Feldmann 1997). Die Bestimmung des relativen Empfindlichkeitsfaktors eines Elements ( $RSF_a$ ), also das Intensitätsverhältnis des Analyten-Signals in dem ICP-MS zur Intensität des Thallium-Signals, wurde durch Vermessung einer Multielement-Standardlösung in 1 % (v / v) Salpetersäure nach folgender Formel bestimmt:

$$RSF_a = \frac{(I_a - I_{a0}) \cdot c_s}{(I_s - I_{s0}) \cdot c_a}$$

mit:

$RSF_a$  = relativer Standardfaktor des Analyten

$I_a$  = Intensität (Zählrate) des Analyten in der Multielement-Standardlösung

$I_{a0}$  = Intensität (Zählrate) des Analyten in der Spüllösung (1 % Salpetersäure)

$I_s$  = Intensität (Zählrate) des Standards (hier TI) in der Multielement-Standardlösung

$I_{s0}$  = Intensität (Zählrate) des Standards (hier TI) in der Spüllösung (1 % Salpetersäure)

$c_s, c_a$  = Konzentrationen des Standards bzw. des Analyten in der Multielement-Standardlösung

Die  $^{205}\text{TI}$ -Standardlösung und der Multielement-Standard werden dem Argon-Plasma der ICP pneumatisch als feuchtes Aerosol zugeführt, welches durch Zerstäubung mittels eines Argon-Gasstromes erzeugt wird. Durch die Zerstäubung gelangt nur ein Teil der Standardlösungen in das Plasma, sodass neben der Flussrate der zugeführten Standardlösung auch die Zerstäubereffizienz einen Einfluss auf die absolute Menge der dem Plasma pro Zeiteinheit zugeführten Thalliumionen hat. Die Bestimmung dieser Parameter erfolgt durch Differenzwägungen der Standardlösung sowie des Ablaufs bei gegebener Analysedauer. Die Bestimmung des relativen Standardfaktors wird für jedes Element, welches für die Analyse von Interesse ist, bestimmt, da die Ionisierung, die Überführung in das Interface und die massenspektrometrische Detektion für jedes Element unterschiedlich ist.

Die absolute Menge des zugeführten Analyt-Ions ( $m_a$ ) wird nach Integration des zeitabhängigen Messsignals der Intensitäten des Analyt- und des Standardions nach Abzug der jeweiligen Grundintensitäten (Blindwerte) in den Integrationsgrenzen nach folgender Formel berechnet:

$$m_a = \int_{t_1}^{t_2} \frac{I_a}{I_s} \cdot \frac{v \cdot z}{RSF_a} \cdot dt$$

mit:

$t$  = Zeit (s)

$t_1, t_2$  = Integrationsflanken

$I_a$  = Intensität des Analytensignals

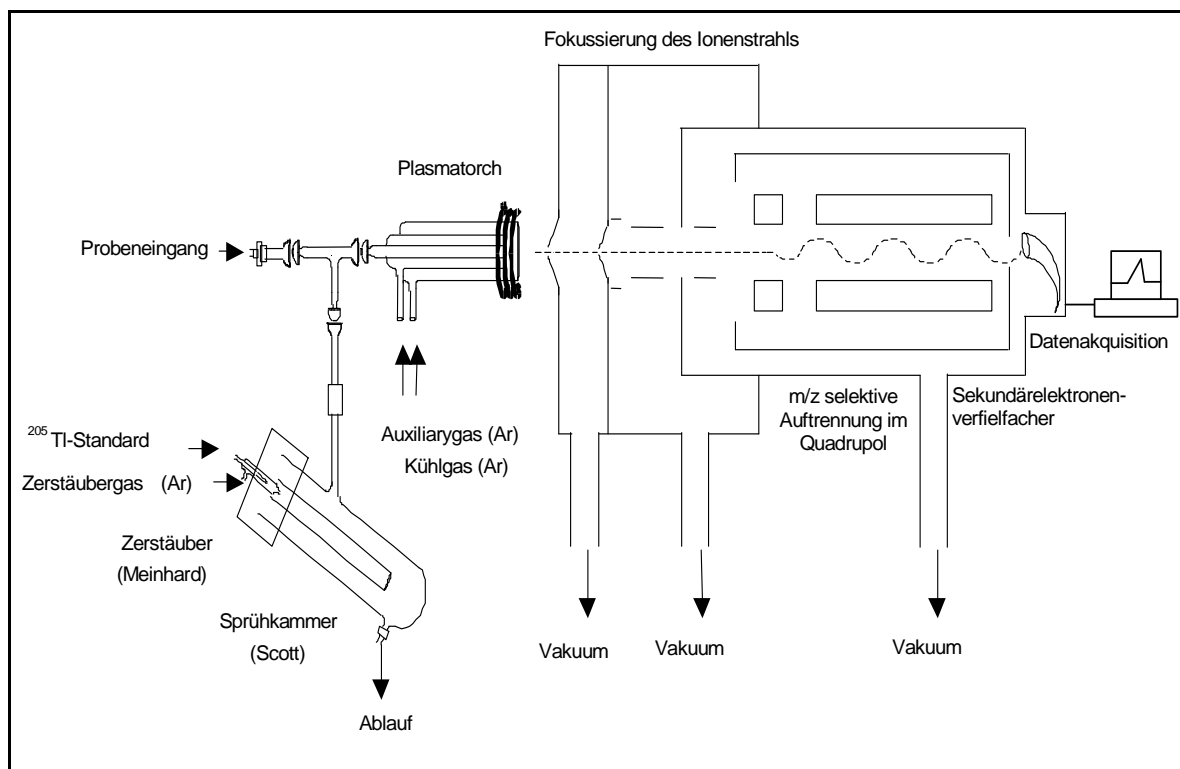
$I_s$  = Intensität des  $^{205}\text{Tl}$ -Standardsignals

$v$  = Fluss der  $^{205}\text{Tl}$ -Standardlösung (ml/s)

$z$  = Zerstäubereffizienz

$RSF_a$  = Relativer Standardfaktor des Analyten zum Signal der  $^{205}\text{Tl}$ -Standardlösung

Der Gesamtfehler der hier beschriebenen Interelement-Kalibrierung liegt im Bereich von  $\pm 30\%$  (Feldmann 1997)



**Abb. 7 Schematischer Aufbau des ICP-MS als Detektionseinheit**

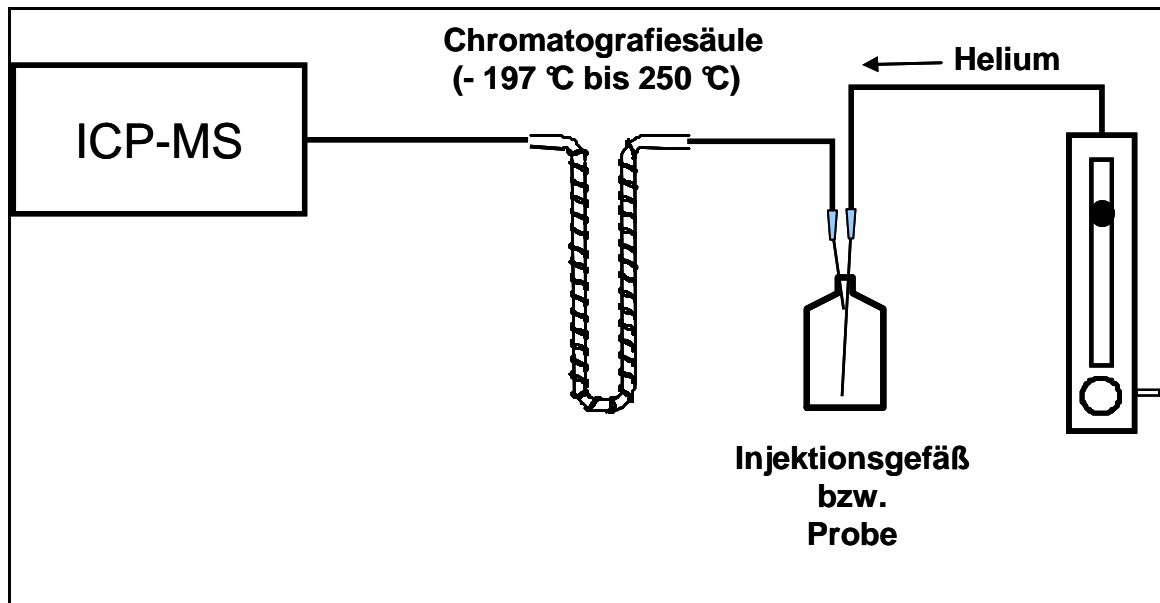
## 2.2.4.2 Gasphasen-Analysen mittels ICP-MS

### Methode 1 „Purge-and-Trap“-GC (PT-GC)

Bei der „Purge-and-Trap“-Methode handelt es sich um eine schonende Separationstechnik, bei der ein Gemisch von gasförmigen Analyten zunächst auf einem hydrophoben Trägermaterial (80/100 Supelcoport™) bei tiefen Temperaturen (-196 °C) angereichert und dann gaschromatografisch separiert werden kann. Verschiedene flüchtige Metall(oid)-Verbindungen können über die Siedepunkt-Retentionszeit-Korrelation und das Masse-Ladungs-Verhältnis der entsprechenden Metall(oid)e identifiziert werden (Michalke 1999).

Die Gasphase der Probe wurde durch einen konstanten Heliumstrom ( $120 \text{ ml min}^{-1}$ ) in das PT-GC eingeleitet und auf der mit flüssigem Stickstoff gekühlten (-196 °C) Chromatographiesäule eingefroren. Dazu wird entweder ein Aliquot der Gasphase mit einer gasdichten Spritze entnommen (*in vitro*-Assays) und in das Injektionsgefäß des GC injiziert oder der Heliumstrom wird direkt durch die Probe geleitet (Mäuseblut-Proben). Durch anschließendes Aufheizen der Chromatografie-Säule auf 250 °C werden die Bestandteile der Gasphase bei Erreichen ihres Siedepunktes von der Säulenmatrix mittels beheizter Transferleitung (80 °C) in das ICP-MS überführt (Michalke et al. 2000).

Da in allen im Folgenden beschriebenen Versuchen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  das einzige volatile Metal(l)derivat in der Gasphase war, diente das PT-GC der Anreicherung dieses Analyten. Um die korrekte Funktion des GC (Dichtigkeit, Heizleistung) während jeder Messung überprüfen zu können, wurden zusammen mit der jeweiligen Probe 100 µl (= 0,2 nmol) eines Dimethylselen-Standards  $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$  injiziert.  $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$  eluierte unter den gewählten GC-Bedingungen nach 115 sec von der Chromatografie-Säule,  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  nach 135 sec. Alle anderen flüchtigen Bismutverbindungen ( $\text{BiH}_3$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{BiH}$  und  $\text{CH}_3\text{BiH}_2$ ) eluierten vor  $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ . Somit diente der  $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ -Standard auch zur Überprüfung der Identität des  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ .



**Abb. 8** Schematischer Aufbau des Purge-and-Trap-GC

Methode 2 ,online'-Messungen

Die ,online'-Messungen wurden durchgeführt um  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktionsraten direkt zu bestimmen. Bei diesen Messungen wurde der Heliumstrom durch die Flüssigphase der Reaktionsgefäße geleitet und diente zum einen dazu, die Reaktanten zu durchmischen und zum anderen, alle flüchtigen Verbindungen direkt nach ihrer Entstehung aus der Flüssigphase auszutreiben und ins Plasma des MS zu leiten. Die Reaktion wurde erst unmittelbar vor dem Beginn einer Messung gestartet, wodurch die Bildung des flüchtigen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  ,online' gemessen werden konnte. Die Reaktionsgefäße wurden während der Messung im Wasserbad auf 30 °C temperiert.



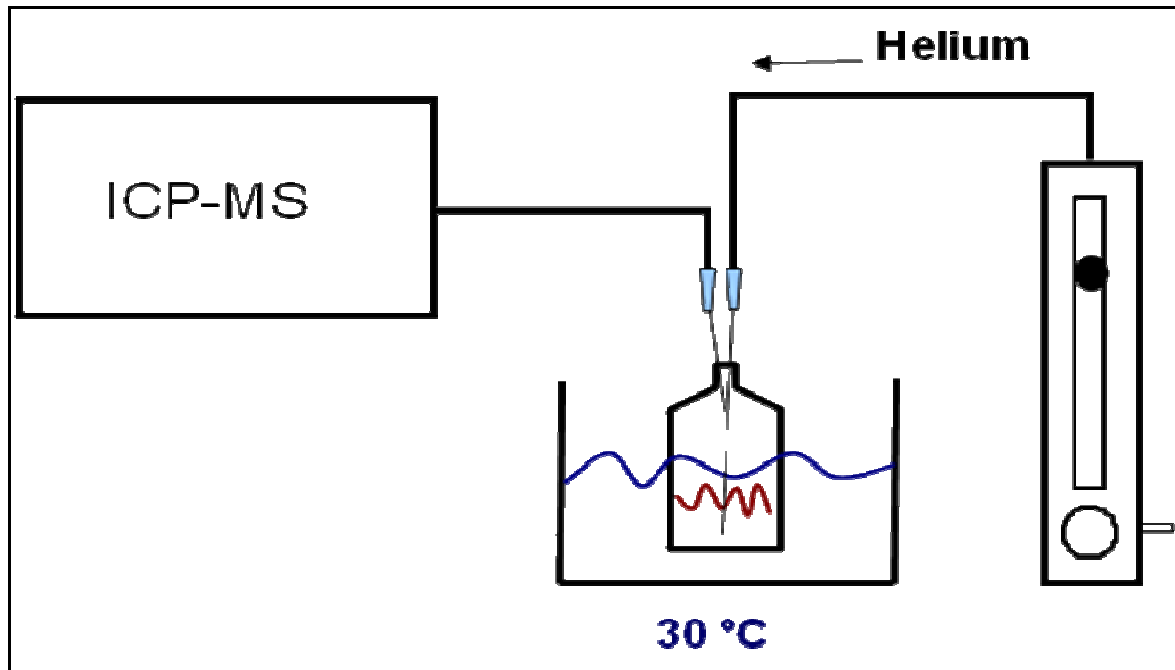


Abb. 9 Versuchsaufbau zur ‚Online‘-Messung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$

#### 2.2.4.3 Gesamtmetallbestimmung

Der Gesamtmetallgehalt flüssiger Proben wurde mittels ICP-MS-Analytik bestimmt. Die entsprechende Menge der zu testenden Probe wurde mit  $10\ \mu\text{l}$   $^{205}\text{Tl}$ -Standardlösung (10 ppm) versetzt (Endgewicht 10 g) um eine Endkonzentration von  $1\ \mu\text{g l}^{-1}$  zu erreichen. Für die Quantifizierung der Metall(oid)e in der Probe wurde das Signal des Analyten auf einen vorher gemessenen Interelementstandard bezogen (siehe 2.2.4.1).

#### 2.2.4.4 *In vitro*-Bismut-Methylierungs-Assays

##### 2.2.4.4.1 Herstellung der Substrate und Lösungen

###### Methyl-(III)-Cobalamin

Eine ausreichend hoch konzentrierte Methyl-(III)-Cobalamin Stammlösung (MeCob) (zwischen  $15 - 30\ \text{mg ml}^{-1}$ ) in  $\text{N}_2/\text{H}_2$ -equilibriertem 50 mM Hepes pH 7,0 wurde unter Rotlicht im Anaerobenzelt unter  $\text{N}_2/\text{H}_2$  Atmosphäre (98 / 2 % (v / v)) angesetzt und anschließend durch einen Sterilfilter filtriert, um ungelöste Teile zu entfernen. Anschließend wurde die fertige Lösung aliquotiert und in lichtundurchlässigen, gasdichten 10 ml Glasgefäßen bei  $4\ ^\circ\text{C}$  gelagert. Ein Aliquot der Stammlösung wurde zur Konzentrationsbestimmung abgenommen.

### Methylcob(III)alamin-Konzentrationsbestimmung

Ein Aliquot der MeCob-Stammlösung wurde 1:100 mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,1 (Endvolumen 1 ml) verdünnt und die Absorption bei 520 nm fotometrisch bestimmt. Als Blindwert wurde die Extinktion einer reinen 50 mM Kaliumphosphatlösung, pH 7,1 abgezogen. Die Konzentration der MeCob-Stammlösung wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet:

$$E_{\lambda} = -\log * (I_1 / I_0) = \epsilon_{\lambda} * c * d$$

mit

$I_1$  = Intensität des transmittierten Lichtes

$I_0$  = Intensität des einfallenden Lichtes

$c$  = Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit

$\epsilon_{\lambda}$  = dekadischer molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$

$d$  = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers

Daraus ergibt sich:

$$c = E_{\lambda} / \epsilon_{\lambda} \times d \text{ mit } d = 1 \text{ cm und } \epsilon_{\lambda 520\text{nm}} = 8,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

### Coenzym M

Eine 15 mM Coenzym M Stammlösung (CoM) in  $\text{N}_2/\text{H}_2$ -equilbriertem 50 mM Hepes pH 7,0 wurde unter  $\text{N}_2/\text{H}_2$  Atmosphäre (98 / 2 % (v / v)) im Anaerobenzelt angesetzt. Die fertige Lösung wurde im Anaerobenzelt gelagert.

### Bismut-Ammoniumcitrat

Bismut-Ammoniumcitrat (Bi-Ammoniumcitrat) ist in wässrigem Milieu schlecht löslich. Eine ausreichend große Menge des Salzes wurde im Anaerobenzelt in  $\text{N}_2/\text{H}_2$ -equilbriertem 50 mM Hepes pH 7,0 suspendiert und über mehrere Stunden gerührt. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (30 min, 13.000 x g, RT) und der Überstand abgenommen. Der Bismutgehalt des Überstandes wurde mittels ICP-MS-Gesamtmetallanalytik bestimmt (siehe 2.2.4.3). Die fertige Lösung wurde im Anaerobenzelt gelagert.

#### 2.2.4.4.2 Bestimmung der Bismut-Methylierungsaktivität von Rohextrakten von *M. mazei* und der rekombinanten MtbA mit und ohne His-tag mittels des *in vitro*-Assays)

Alle *in vitro*-Bismut-Methylierungs-Assays wurden unter N<sub>2</sub> / H<sub>2</sub> Atmosphäre (98 / 2 % (v / v)) im Anaerobenzelt angesetzt. Alle Substrate und sonstigen Bestandteile des Reaktionsansatzes wurden mindestens eine Woche vor Gebrauch zum Äquilibrieren im Anaerobenzelt gelagert, um Sauerstoffreste zu entfernen.

##### Methode 1: Injektion + ‚Purge-and-Trap‘

Bei Methode 1 wurden die *in vitro*-Bismut-Methylierungs-Assays in lichtundurchlässigen 20 ml braunen Gasraumglasflaschen (= Reaktionsvials) in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml angesetzt, die gasdicht mit einem Butylstopfen verschlossen wurden. Für die biotischen Testansätze wurde 600 µg ml<sup>-1</sup> Rohextrakt bzw. angereicherte Proteinfraction mit Bismut-Methylierungsaktivität, 50 mM Hepes, 1 – 10 µM Bismut-Ammonium-Citrat sowie teilweise 1500 µM Coenzym M vorgelegt. Die abiotischen Testansätze wurden entsprechend ohne Protein angesetzt. Die Assays wurden durch Zugabe von Methylcobalamin gestartet. Die Ansätze wurden 5 Minuten schüttelnd (100 rpm) bei 30 °C inkubiert (in einigen Fällen länger, zum Teil über Nacht). Zu bestimmten Zeiten wurde ein 1 ml-Aliquot der Gasphase mit einer gasdichten Spritze entnommen und in das Probengefäß des PT-GC injiziert (siehe 2.2.4.2).

##### Methode 2: ‚online‘

Bei Methode 2 wurden die *in vitro*-Bismut-Methylierungs-Assays (Gesamtvolumen 1 ml) in lichtundurchlässigen (mit Alufolie umwickelten) 10 ml Reaktionsvials angesetzt, die gasdicht mit einem Butylstopfen verschlossen wurden. Es wurde jeweils eine 3-fach Bestimmung für jeden Parameter durchgeführt. Dazu wurde ein Protein-Vorinkubations-Mix angesetzt, der das rek. Enzym mit den jeweils auf ihre Wirkung zu testenden Komponenten bzw. nur den obligaten Assay-Komponenten (Bi-Ammoniumcitrat und CoM) oder nur das Enzym enthielt und ein Reaktionsstart-Mix, der die restlichen Komponenten des Ansatzes enthielt und direkt in den Reaktionsvials vorgelegt wurde. Generell enthielt der Reaktionsstart-Mix Methylcobalamin, da diese Substanz lichtsensitiv ist und deswegen bis zum Reaktionsstart in den lichtundurchlässigen Reaktionsvials aufbewahrt werden musste.

Beispiel: Bei einem Standardansatz wurde der Methylgruppendonator Methylcobalamin in die Reaktionsvials vorgelegt (Reaktionsstart-Mix) und das Enzym mit Bi-Ammoniumcitrat und CoM in 50 mM Hepes pH7 im Protein-Vorinkubations-Mix gemischt.

Der Start der Reaktion erfolgte durch Injektion des Protein-Vorinkubations-Mix in das Reaktionsgefäß, das den Reaktionsstart-Mix enthielt, der 2 min bei 30 °C in einem Wasserbad vorinkubiert wurde und die  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion wie unter 2.2.4.2 beschrieben ‚online‘ mittels ICP-MS analysiert.

#### 2.2.4.5 Qualitativer Nachweis teilmethylierter Bismutspezies mittels Ethylierung und Detektion mittels PT-GC/ICP-MS-Analyse

Teilmethylierte, nicht-flüchtige Bismutspezies in der Flüssigphase einiger *in vitro*-Assays wurden durch Ethylierung verflüchtigt und nach chromatografischer Trennung mittels ICP-MS-Analytik nachgewiesen. Dazu wurde ein Aliquot der Probe in 5 ml Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) aufgenommen. Anschließend wurde 1 ml Natriumtetraethylborat (1 % (w/w) (Galab, Geesthacht, Deutschland) stabilisiert mit 1 % (w/w) NaOH-Lösung) zur Ethylierung zugegeben. Die Gasphase der Glasgefäße wurde 15 Minuten mit einem konstanten Heliumstrom ( $90 \text{ ml min}^{-1}$ ) ausgetrieben, in das PT-GC eingeleitet und auf der mit flüssigem Stickstoff gekühlten ( $-196 \text{ °C}$ ) Chromatographiesäule eingefroren. Durch anschließendes Aufheizen der Chromatografie-Säule auf  $250 \text{ °C}$  werden die Analyten durch einen konstanten Heliumstrom ( $140 \text{ ml min}^{-1}$ ) bei Erreichen ihres Siedepunktes von der Säulenmatrix über die beheizte Transferleitung ( $80 \text{ °C}$ ) in das ICP-MS überführt (Michalke et al. 2000). Anhand der Siedepunkt-Retentionszeit-Korrelation können die Verbindungen identifiziert werden. Als Referenzsubstanzen dienten  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  (aus den *in vitro*-Assays) und  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Bi}$ , das durch Ethylierung von Bi-Ammoniumcitrat hergestellt wurde, und die Retentionszeit unter den gewählten Versuchsbedingungen ermittelt. Die Retentionszeiten von  $(\text{CH}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_5)\text{Bi}$  und  $(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Bi}$  wurden experimentell ermittelt, da für beide Substanzen keine Standards verfügbar sind.

**Tab. 10 Siedepunkte und Retentionszeiten der Analyten unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen**

Analyt	Siedepunkt [°C]	Retentionszeit [sec]
$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	110 (Weast 1988)	80 – 90
$(\text{CH}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_5)\text{Bi}$	nicht bekannt	95 – 106
$(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Bi}$	nicht bekannt	108 – 118
$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Bi}$	170 (extrapoliert nach (Suzuki 2001))	132 – 150

#### 2.2.4.6 Methyltransferase-Aktivitätsbestimmung der rekombinanten MtbA mittels UV/VIS-Spektrometrie

Zur Bestimmung der Aktivität der MtbA wurde die Demethylierung des Methylcobalamins spektrofotometrisch bestimmt (UV/VIS Spektralfotometer Specord 200 mit der Software WinASPECT<sup>®</sup>, Analytik Jena AG, Jena) und gleichzeitig die Bildung von Cob(I) verfolgt. Der Methylierungs-Assay wurde im Anaerobenzelt in einer Quarzglas-UV-Küvette (1 ml) unter Rotlicht zum Schutz vor lichtinduzierter Demethylierung angesetzt und zu Beginn der UV/VIS-Messung durch Zugabe von Methylcobalamin gestartet. Es wurde ein beheizbarer Küvettenwechsler (30 °C) benutzt und gegen 50 mM Hepes referenziert.

Ein typischer CoM-Methylierungs-Ansatz (1 ml Endvolumen) zur Charakterisierung der nativen Reaktion der MtbA setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

10 µg ml<sup>-1</sup> MtbA, 260 µM MeCob und 1500 mM CoM in 50 mM Hepes pH7. Zur Charakterisierung der Reaktion der MtbA in Gegenwart von Bismut wurden zusätzlich 75 µM Bi-Ammoniumcitrat nach 5 min zum Reaktionsansatz gegeben, nachdem die Cob(I)-Konzentration ein konstantes Niveau erreicht hatte.

Das Spektrum von 200 – 600 nm wurde in Schritten von 1 nm gemessen.

Die MeCob-Demethylierung sowie die Bildung von Cob(I) wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet:

$$E_{\lambda} = -\log(I_1 / I_0) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

mit

$I_1$  = Intensität des transmittierten Lichtes

$I_0$  = Intensität des einfallenden Lichtes

$c$  = Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit

$\epsilon_{\lambda}$  = dekadischer molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$

$d$  = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers

Daraus ergibt sich:

$$c = E_{\lambda} / \epsilon_{\lambda} \times d \text{ mit } d = 1 \text{ cm und } \epsilon_{\lambda} \text{ (siehe Tab. 11).}$$

**Tab. 11** Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten, die zur Quantifizierung von MeCob und Cob(I) genutzt wurden

	Wellenlängen der Absorptionsmaxima	Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\lambda}$
<b>Cob (I)</b>	388 nm	$\epsilon_{\lambda 388\text{nm}} = 32 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
<b>MeCob</b>	520 nm	$\epsilon_{\lambda 520\text{nm}} = 8,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

#### 2.2.4.7 Homogenisieren und Trocknen der Mäuseorgane und der Blutproben

Die Organe der Versuchsmäuse wurden mit dem Mikrodismembrator S (Sartorius) homogenisiert. Die Organe wurden in die stickstoffgekühlte Teflon-Aufschlusszelle gefüllt und 5 Minuten bei 3.000 rpm mittels einer Stahlkugel homogenisiert.

Das Homogenisat der Organe sowie die Blutproben wurden auf Glaspetrischalen 3 Tage bei 110 °C im Ofen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

#### 2.2.4.8 Mikrowellendruckaufschluss

Um den Gesamtmetallgehalt in den Mäuseorganen und im Blut wie unter 2.2.4.3 beschrieben mittels ICP-MS bestimmen zu können, wurden diese Matrices nach der Homogenisierung und Trocknung mit Hilfe des Mikrowellensystems MARS 5 aufgeschlossen. Zwischen 0,2 – 0,5 g der jeweiligen Proben wurden mit 4 ml HNO<sub>3</sub> (65 %) und 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in getrennten Mikrowellendruckaufschluss-Teflongefäßen gemischt. Zusätzlich wurden jedem Gefäß vier Siedesteinchen zugefügt. Die Aufschlüsse wurden mit dem folgenden Temperatur- und Druckverlauf durchgeführt:

**Tab. 12** Aufschlussprogramm MARS 5 Mikrowellensystem

Ramp No.	Time [min]	Maximum Pressure [bar]	Temperature [°C]	Hold Time [min]
1	10	5	80	10
2	4	25	130	2
3	4	40	200	10

Anschließend wurden die Proben mit A. bidest. auf ca. 40 g Gesamtgewicht aufgefüllt. Aufgrund der Dichteunterschiede von HNO<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O wurden alle Angaben auf die Einwaage bezogen.

### 2.2.4.9 Quantifizierung von Trimethylbismut im Blut von konventionellen und keimfreien Mäusen

#### Aufzucht und Fütterung der Mäuse

Das Fütterungsexperiment wurde 14 Tage an konventionellen und keimfreien C3H/HeJ Mäusen (*Mus musculus*, Alter zwischen 12 und 17 Wochen) mit einem Bismut-angereicherten Spezialfutter (SNIFF V1534Bi) durchgeführt. Die Bismut-Konzentration des Pharmazeutikums De-Noltab® (als Colloidal-Bismutsubcitrat (CBS)) entsprach pro kg Futter 6 g Bismuttrioxid ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ), sodass 30 mg des Bismutmedikaments durch die Maus bei einer angenommenen mittleren Futteraufnahme von 5 g Futter pro Tag aufgenommen wurden. Die Tagesdosis der aufgenommenen Menge an Bismut betrug damit ca. 996 mg pro kg Lebendgewicht (durchschnittliches Lebendgewicht pro Maus: 30 g).

Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen eingeteilt:

**Tab. 13 Versuchstiergruppen**

<b>Gruppe</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Anzahl der Tiere</b>	<b>Untergruppen</b>
<b>KONV-Gruppe</b>	konventionell gezogene Tiere mit intakter Darmmikrobiota	34	U-Gr. 1-1 bis 1-11; je 3 – 4 Tiere
<b>KF Gruppe</b>	keimfreie Tiere (ohne Darmmikrobiota),	28	U-Gr. 2-1 bis 2-7; je 3 – 5 Tiere
<b>KONV-Kontroll-Gruppe</b>	konventionell gezogene Tiere mit intakter Darmmikrobiota	9	U-Gr. 4-1 bis 4-3; je 3 Tiere

#### Probennahme

Nach der Bismut-Diät wurden die Mäuse in Ketamin/Xylazin-Narkose (Ketamin 120mg/Xylazin 13 mg pro kg Körpergewicht, intraperitoneal) versetzt und ihnen wurde per Herzpunktion eine möglichst große Blutmenge (ca. 1,2 – 4,3 g) entnommen. Das Blut von jeweils 3 – 5 Mäusen (je nach Ausbeute pro Tier) wurde sofort in sterile 120 ml Serumflaschen mit 9 ml A. bidest., 1 ml Antifoam 204 (Sigma) (1:100 vorverdünnt) und 300 µl Heparin (25,000 IE  $\text{ml}^{-1}$ ) unter Heliumatmosphäre injiziert. Nach der letalen Blutabnahme wurde den Tieren das Genick gebrochen und anschließend wurden die Organe (Lunge, Leber, Niere, Hirn, Hoden) zum späteren Nachweis von Bismut in diesen

Gewebe entnommen (siehe Mikrowellendruckaufschluss und Gesamtmetallbestimmung 2.2.4.8 und 2.2.4.3).

Trimethylbismutbestimmung in den Blutproben

Die Analyse auf das flüchtige  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  erfolgte wie unter 2.2.4.2 beschrieben mittels PT-GC/ICP-MS.



### 3 Ergebnisse

#### Teil I: Produktion von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ im Intestinaltrakt von Mäusen

##### 3.1 Einfluss der Darmmikrobiota auf die Metabolisierung und Verteilung von oral aufgenommenem colloidalen Bismutsubcitrat (CBS)

Die Transformation von Metallen und Metalloiden zu flüchtigen Derivaten findet bevorzugt in anaeroben Habitaten statt. Zudem weisen *ex-situ* Analysen an Fäzes-Proben von Probanden darauf hin, dass auch im Intestinum von Mammalia flüchtige methylierte Derivate von verschiedenen Metallen und Metalloiden gebildet werden (Meyer *et al.* 2008). Um die Bedeutung der intestinalen Mikrobiota von Mammalia bei der Derivatisierung von Metallen und Metalloiden zu flüchtigen Verbindungen mit z. T. hoher Toxizität zu belegen, wurden konventionell gezogene Mäuse (KONV-Gruppe mit acht Untergruppen) und keimfreie Mäuse (KF-Gruppe mit sieben Untergruppen) mit Bismut angereichertem Futter (6g  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  pro 1kg Futter) über 14 Tage angezogen und anschließend der Gehalt an  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  im Blut der Versuchstiere mittels PT-GC/ICP-MS-Analytik bestimmt. Außerdem wurde der Gesamtbismutgehalt in Leber, Lunge, Nieren, Hirn und Hoden analysiert, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  im Blut und einer Anreicherung von Bismut in den Organen zu prüfen.

Als Kontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen mit Standardfutter ohne  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  gezogen (KONV-Kontroll-Gruppe mit drei Untergruppen) und entsprechend der KONV-Gruppe und der KF-Gruppe analysiert.

##### 3.1.1 $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Gehalt im Blut der KONV-Gruppe und der KF-Gruppe

Bei der Blutentnahme mittels Herzpunktion konnte den Tieren jeweils ca. 1,2 – 4,3 g Blut entnommen werden (siehe Tab. 14). Das Blut von je drei bis fünf Tieren (je nach erhaltenem Blutvolumen pro Tier) wurde in sterile, gasdichte 120 ml Serumflaschen unter Heliumatmosphäre überführt (siehe 2.2.4.9).

Der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Gehalt der Proben wurde anschließend sofort mittels PT-GC/ICP-MS-Analytik (siehe 2.2.4.2) bestimmt. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tab. 14 – Tab. 16 und Abb. 10 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 14  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Gehalt der Blutproben der KONV-Gruppe

<i>Probe</i>	<i>entnommene Blutmenge [g]</i>	<i><math>(\text{CH}_3)_3\text{Bi}</math> gesamt [fmol]</i>	<i><math>(\text{CH}_3)_3\text{Bi}</math> [fmol g<sup>-1</sup> Blut]</i>
Untergruppe 1-1	3	44.7	15.1
Untergruppe 1-2	4,3	72.5	16.8
Untergruppe 1-3	2,9	209.1	71.4
Untergruppe 1-4	3,4	28.3	8.4
Untergruppe 1-5	3,1	19	6.2
Untergruppe 1-6	3	106.1	35
Untergruppe 1-7	2,9	35.3	12.3
Untergruppe 1-8	3,5	26	7.4

Tab. 15  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Gehalt der Blutproben der KF-Gruppe

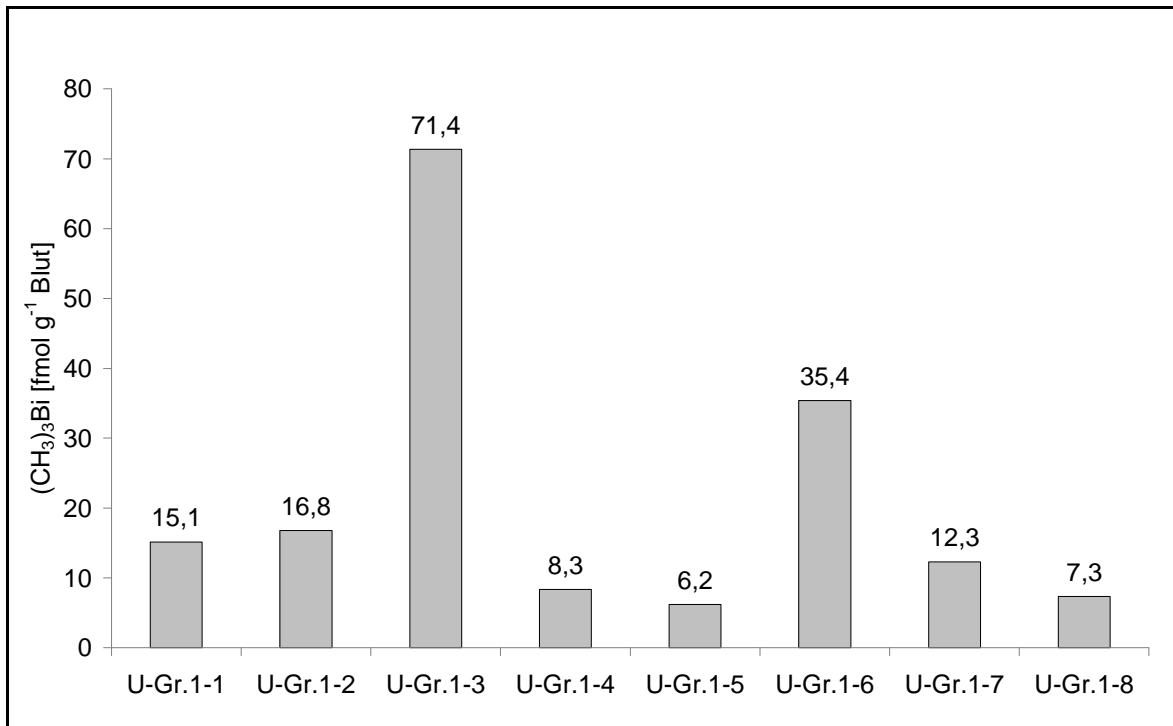
<i>Probe</i>	<i>entnommene Blutmenge [g]</i>	<i><math>(\text{CH}_3)_3\text{Bi}</math> gesamt [fmol]</i>
Untergruppe 2-1	2,2	DL
Untergruppe 2-2	2,3	DL
Untergruppe 2-3	2,1	DL
Untergruppe 2-4	2,6	DL
Untergruppe 2-5	1,8	DL
Untergruppe 2-6	2	DL
Untergruppe 2-7	1,2	DL

DL = Detektionslimit

Tab. 16  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  -Gehalt der Blutproben der KONV-Kontroll-Gruppe

<i>Probe</i>	<i>entnommene Blutmenge [g]</i>	<i><math>(\text{CH}_3)_3\text{Bi}</math> gesamt [fmol]</i>
Untergruppe 3-1	1,9	DL
Untergruppe 3-2	2,5	DL
Untergruppe 3-3	2,9	DL

DL = Detektionslimit



**Abb. 10** (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Gehalt im Blut der KONV-Untergruppen nach 2-wöchiger Bismut-Diät. Die Analyse erfolgte nach 5-minütigem Spülen der Probe mit Helium.

In den Blutproben der KONV-Gruppe wurden zwischen 6,2 und 71,4 fmol (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi g<sup>-1</sup> Blut detektiert, während in den Proben der KF-Gruppe kein (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi oberhalb des Detektionslimits identifiziert werden konnte. Im Blut der KONV-Kontroll-Gruppe wurde ebenfalls kein (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi detektiert.

Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Darmmikrobiota eine wesentliche Rolle bei der Transformation des anorganischen Bismuts zu (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi spielt.

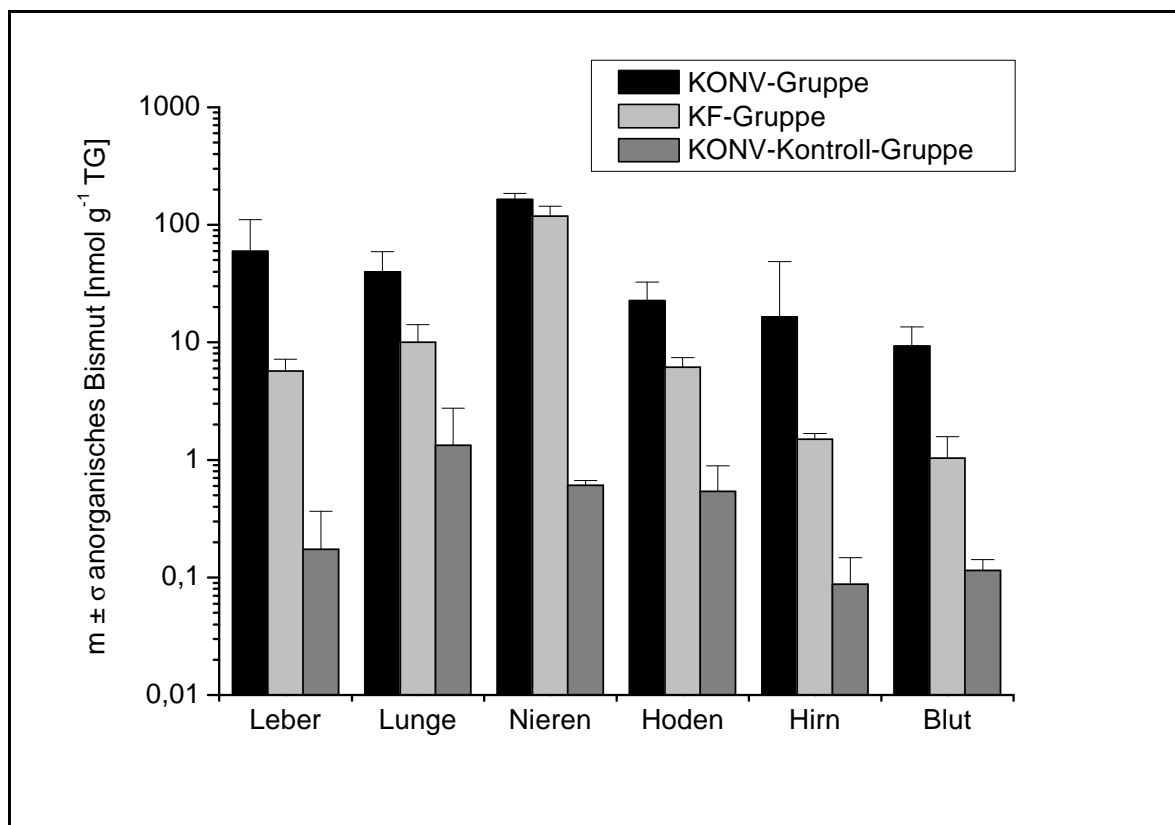
### 3.1.2 Bestimmung des Gesamtbismutgehaltes in Leber, Lunge, Niere, Hoden und Hirn der KONV-, KF- und KONV-Kontroll-Gruppe

Der Gehalt an anorganischem Bismut der homogenisierten und druckaufgeschlossenen Organ- und Blutproben der Mäuse wurde mittels ICP-MS-Analytik bestimmt. In Tab. 17 und Abb. 11 ist ein Überblick über die Ergebnisse gegeben.

Die den Mittelwerten zugrunde liegenden Einzelwerte sind in Tab. 29 im Anhang zusammengefasst.

**Tab. 17** Mittelwert und Standardabweichung der gemessenen Bismutkonzentration [nmol g<sup>-1</sup> TG] der Organe und Blutproben der KONV-, KF- und KONV-Kontroll-Gruppe

<b>Bismutgehalt <math>m \pm \sigma</math> [nmol g<sup>-1</sup> TG]</b>			
	<b>KONV-Gruppe (n = 8)</b>	<b>KF-Gruppe (n = 7)</b>	<b>KONV Kontroll-Gruppe (n = 3)</b>
<b>Leber</b>	59,8 ± 50,8	5,7 ± 1,5	0,2 ± 0,2
<b>Lunge</b>	40 ± 19,1	10 ± 4,2	1,3 ± 1,4
<b>Nieren</b>	165 ± 19,7	118,2 ± 25,3	0,6 ± 0,1
<b>Hoden</b>	22,7 ± 9,9	6,2 ± 1,3	0,5 ± 0,4
<b>Hirn</b>	16,5 ± 32,3	1,5 ± 0,2	0,1 ± 0,1
<b>Blut</b>	9,3 ± 4,3	1 ± 0,5	0,1 ± 0,03



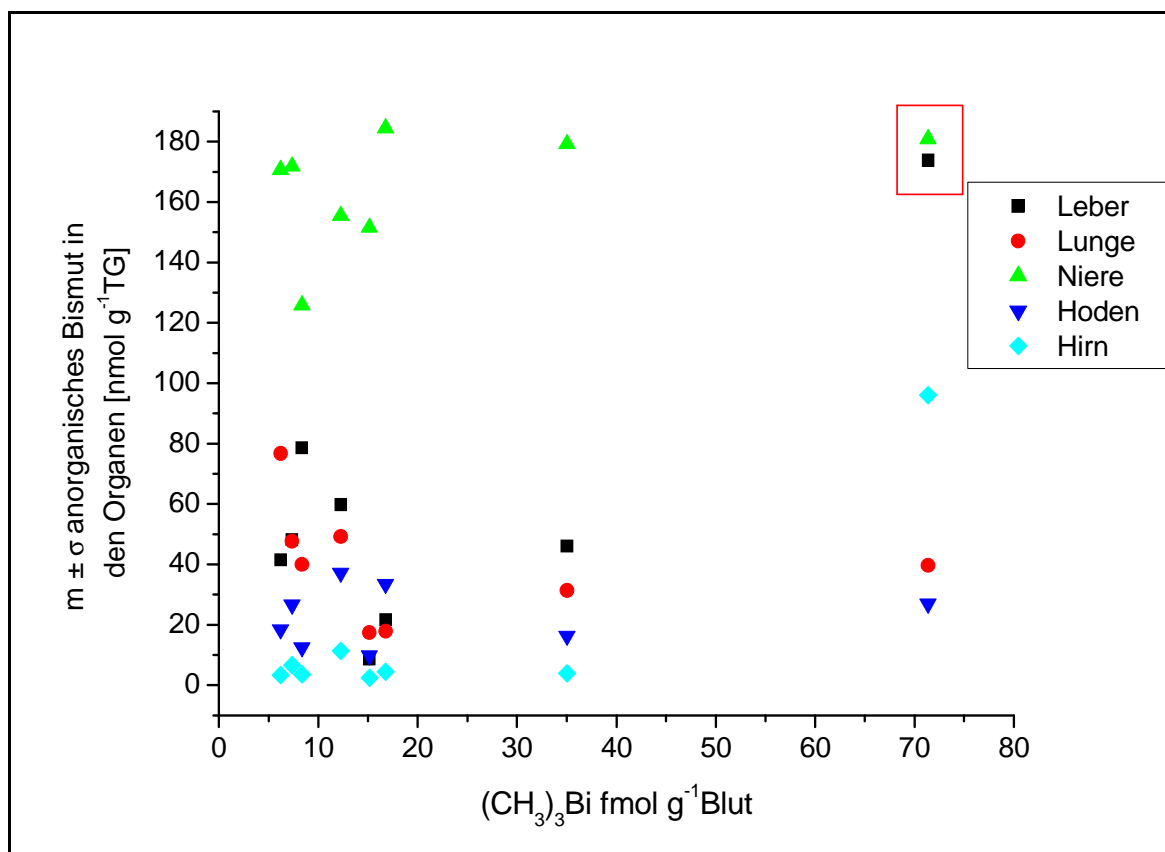
**Abb. 11** Mittlere Bismutgehalte [nmol g<sup>-1</sup> TG] der Organe und Blutproben der Gruppe 1 – 3. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der gemessenen Bismutkonzentrationen mit Standardabweichungen.

In Abb. 11 ist zu erkennen, dass der Bismutgehalt in den Organen der KONV-Gruppe signifikant höher ist, als in den Organen der KF-Gruppe. Lediglich in der Niere der

KF-Gruppe fanden sich vergleichbare Konzentrationen Bismut (KONV-Gruppe Mittelwert =  $171.3 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ , KF-Gruppe Mittelwert =  $125.9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ ). Bei allen Gruppen war der Bismutgehalt im Hirn am niedrigsten. In den Organen der KONV-Kontroll-Gruppen wurden lediglich kleine Mengen Bismut detektiert.

### 3.1.3 Korrelation des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Gehaltes im Blut mit dem Bismutgehalt in den Organen

Wie in den Abschnitt 3.1.2 dargestellt, lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  im Blut der Versuchstiere und dem Gehalt anorganischen Bismuts in den untersuchten Organen ableiten. In Abb. 12 sind die ermittelten Bismut-Gehalte der verschiedenen Organe gegen die im Blut gefundenen Konzentrationen an flüchtigem  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  der jeweiligen Untergruppen der KONV-Gruppe aufgetragen, um erkennen zu können, ob es zusätzlich zu der qualitativen auch eine quantitative Korrelation zwischen den beiden Verbindungen gibt.



**Abb. 12** Verhältnis der absoluten Bismutgehalte [ $\text{nmol g}^{-1} \text{ TG}$ ] der Organe der einzelnen Untergruppen der KONV-Gruppe und dem  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Gehalt der Blutproben der Untergruppen.

Wie in Abb. 12 ersichtlich, ist keine Korrelation zwischen der Konzentration von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  der Blutproben und dem Gehalt an anorganischem Bismut in den Organen der

KONV-Gruppe zu erkennen. Für einen gewissen Einfluss der Konzentration von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  des Blutes auf den Bismut-Gehalt der Organe sprechen allenfalls die Analysen der Leber- und Hirnproben, die die höchste Anreicherung von Bismut in den beiden Organen bei den höchsten  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Werten des Blutes ( $71,4 \text{ fmol g}^{-1}$ ) ergaben.

## Teil II: Charakterisierung der *in vitro*-Bismut-Methylierung

Wie in Teil I dieser Arbeit beschrieben, spielt die biotische Methylierung von Bismut eine wichtige Rolle bei dessen Volatilisierung und Verteilung im Säugerorganismus. Die Produktion flüchtiger Bismutverbindungen (vor allem  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ ) konnte auch in Reinkulturen verschiedener Methanoarchaea in Gegenwart von  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  nachgewiesen werden. Beispiele hierfür sind Kulturen von *Methanobacterium formicicum* (Michalke 1999), *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanococcus vanielii* und *maripaludis*, *Methanolacinia paynteri*, *Methanolobus tindarius*, *Methanoplanus limicola* sowie *Methanosarcina barkeri* (Meyer 2007) und *Methanosarcina mazei* (Thomas 2006). Für *M. mazei* konnte zudem gezeigt werden, dass die  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktionsrate in Gegenwart von bis zu  $1 \text{ }\mu\text{M}$   $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  im Anzuchtmedium am höchsten war und mit steigender Bismutkonzentration (bis  $100 \text{ }\mu\text{M}$ ) wieder abnahm. Bei Bismutkonzentration  $\geq 10 \text{ }\mu\text{M}$  war allerdings ein deutlich hemmender Einfluss auf das Zellwachstum zu erkennen (Thomas 2006). Mit dialysierten Rohextrakten von *M. formicicum* (Michalke 1999) und ebenso in Vorversuchen mit Rohextrakt von *M. mazei* konnte eine Methylcobalamin-abhängige Genese von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  beobachtet werden, die zusätzlich von der Gegenwart von Coenzym M abhängt. Diese Beobachtung führte zu dem Verdacht, dass eine der sechs homologen Methylcobalamin- und Coenzym M-abhängigen Methyltransferasen der Methanogenese in *M. mazei* für die Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  verantwortlich sein könnten.

Um diese Vermutung zu überprüfen, sollten methylierungsaktive Proteinfractionen aus dem Rohextrakt von *M. mazei* angereichert und auf ihre Methylierungsaktivitäten getestet werden. Die Zellen wurden mit Trimethylamin als Substrat gezogen, um eine präferierte Expression der Methyltransferasen zu erreichen, die an der methylo trophen Methanogenese ausgehend von methylierten Aminen beteiligt sind ( $\text{MtbA}_{1-3}$  siehe Einleitung).

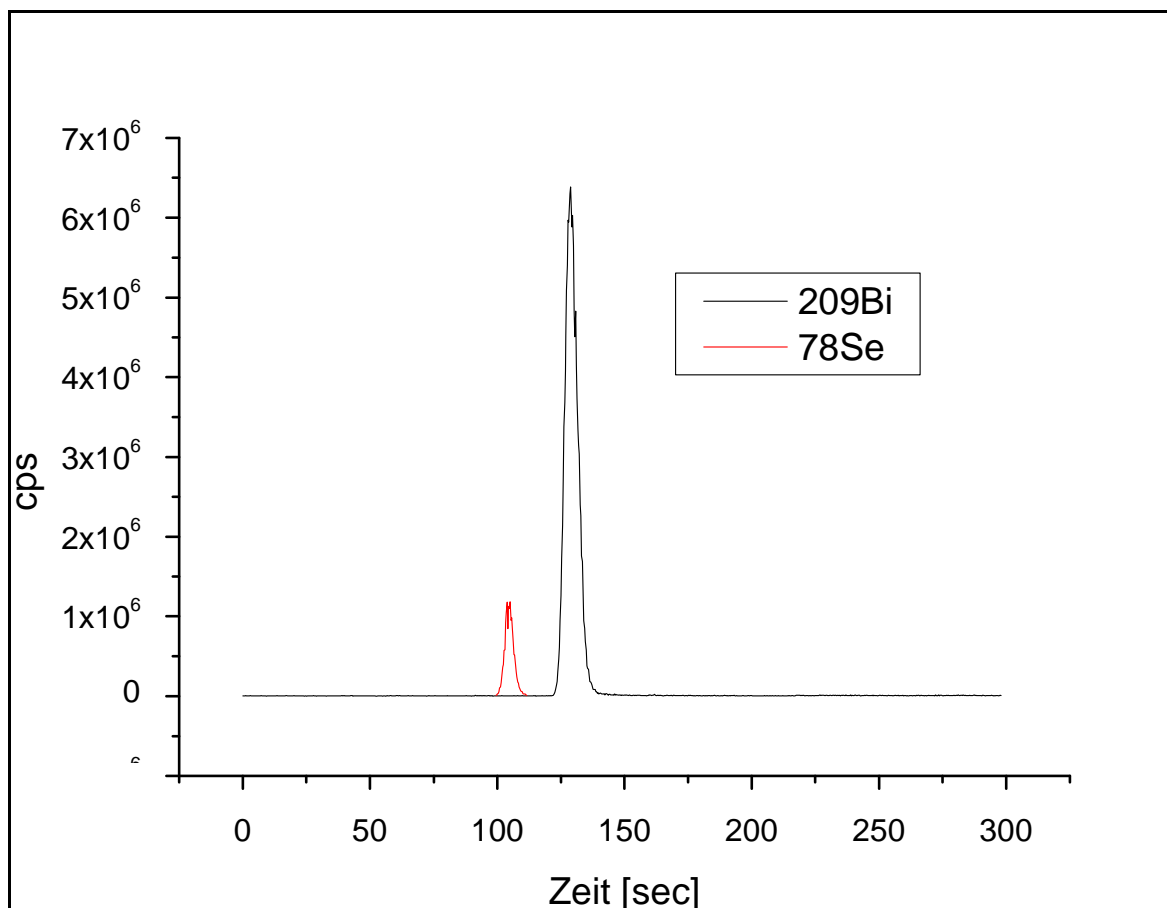
Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollten dann detaillierte Untersuchungen zur enzymatischen Bismut-Methylierung an heterolog exprimierter *MtbA* (orf 1439) durchgeführt werden. Gleichzeitig sollte untersucht werden, unter welchen Voraussetzungen auch eine abiotische Methylierung von Bismut stattfindet.

Für die Analyse der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion wurden je nach Fragestellung: a) Bestimmung der Gesamtproduktion des Testansatzes oder b) Analyse des Zeitverlaufs der Reaktion verschiedene Messmethoden angewendet:

Messmethode 1: „Purge and Trap“ (siehe 2.2.4.2)

Diese Methode wurde immer dann angewendet, wenn die Menge an gebildetem  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  zu einem bestimmten Zeitpunkt bestimmt werden sollte.

Ein Aliquot (1 ml) der Gasphase wurde nach Ablauf der Reaktion mit einer gasdichten Spritze entnommen, auf einer Chromatografie-Säule kryofokussiert und nach anschließender Chromatografie mittels ICP-MS identifiziert. Ein typisches Chromatogramm nach Injektion eines 1 ml-Aliquots der Gasphase eines *in vitro*-Ansatzes (Protein-Vorinkubations-Mix mit  $600 \mu\text{g ml}^{-1}$  Rohextrakt von *M. mazei*,  $1500 \mu\text{M}$  CoM,  $10 \mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat und Reaktions-Start-Mix mit  $750 \mu\text{M}$  MeCob) ist in Abb. 13 dargestellt.



**Abb. 13** Typisches Chromatogramm einer PT-GC/ICP-MS-Analyse (Methode ‚Purge and Trap‘) nach Injektion von 1 ml Gasphase eines *in vitro*-Ansatzes nach 5-minütiger Inkubation mit  $600 \mu\text{g ml}^{-1}$  Rohextrakt von *M. mazei*,  $1500 \mu\text{M}$  CoM,  $10 \mu\text{M}$  Bismut-Ammonium-Citrat und  $750 \mu\text{M}$  MeCob und  $100 \mu\text{l}$  des  $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ -Standards. Der Ansatz wurde durch Zugabe des Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix gestartet.

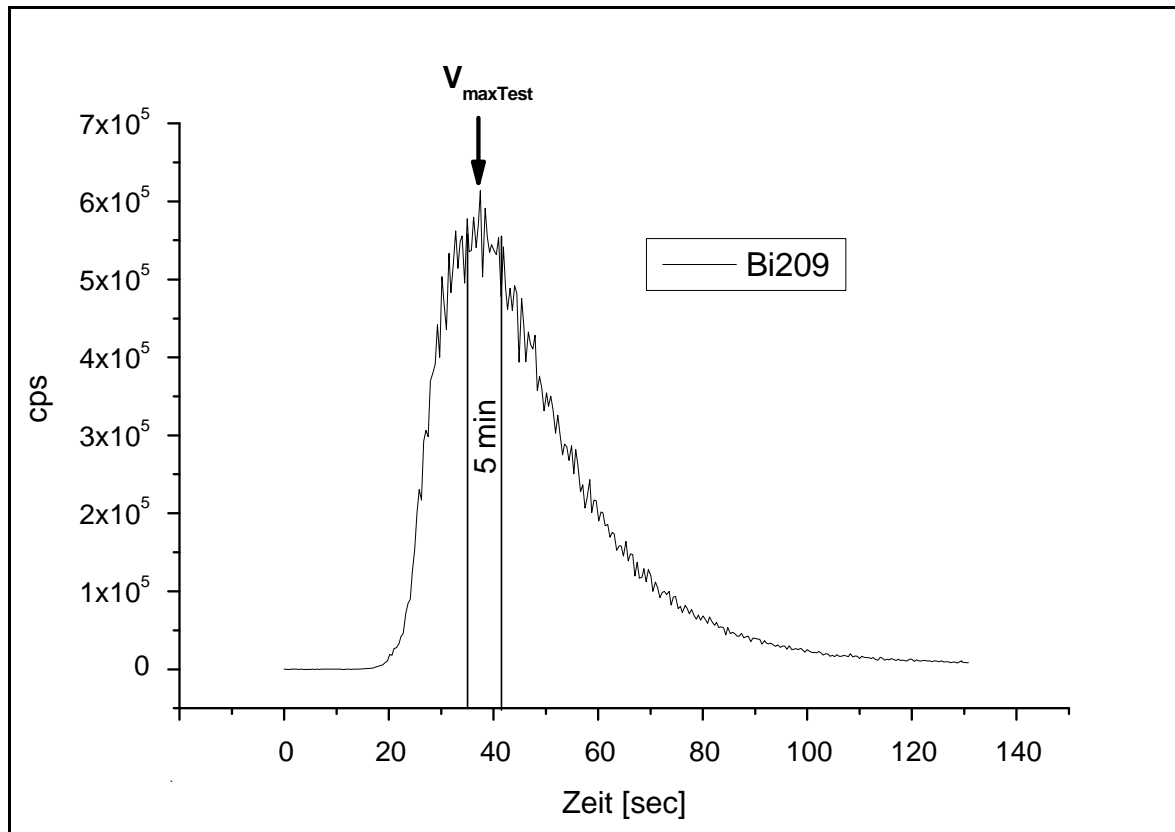
Der Peak eluiert nach 135 sec von der Chromatografie-Säule. Durch Detektion des Masse-Ladungsverhältnisses mittels ICP-MS (für Bismut:  $m/z = 209$ ) und anhand der Siedepunkts-Retentionszeit-Korrelation sowie des Vergleichs mit dem  $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ -Standard (Elution nach 115 sec) kann der Peak eindeutig als  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  identifiziert werden. Das Integral des Kurvenverlaufs im gegebenen Beispiel (Abb. 13) entspricht  $8,4 \text{ pmol mg}^{-1}$   $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  in 1 ml Gasphase nach 5-minütiger Inkubation.

#### Messmethode 2: ‚Online‘ (siehe 2.2.4.2)

Die Methode 2 wurde angewendet, wenn  $V_{\text{max}}$  einer enzymatischen Reaktion unter spezifischen (Test-)Bedingungen bestimmt werden sollte (im Folgenden bezeichnet als  $V_{\text{maxTest}}$ ). Hierbei wird vom Start an die Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  im Reaktionsgefäß im ICP-MS verfolgt. Der Heliumstrom wird direkt durch die Probe geleitet, wodurch das gebildete  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  sofort nach seiner Bildung aus der Flüssigphase ausgetrieben wird und direkt ins



ICP-MS gelangt. In Abb. 14 ist ein typischer Kurvenverlauf der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung in einem *in vitro*-Ansatz (Protein-Vorinkubations-Mix mit  $600 \mu\text{g ml}^{-1}$  Rohextrakt von *M. mazei*,  $1500 \mu\text{M}$  CoM,  $10 \mu\text{M}$  Bismut-Ammonium-Citrat und Reaktionsstart-Mix mit  $750 \mu\text{M}$  MeCob, Gesamtvolumen 1 ml) dargestellt.



**Abb. 14** Typischer Kurvenverlauf der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion einer ICP-MS-Messung (Methode 2 ,online') eines *in vitro*-Ansatzes mit  $600 \mu\text{g ml}^{-1}$  Rohextrakt von *M. mazei*,  $1500 \mu\text{M}$  CoM,  $10 \mu\text{M}$  Bismut-Ammonium-Citrat im Protein-Vorinkubations-Mix und  $750 \mu\text{M}$  MeCob. Reaktionsstart-Mix.

Im Unterschied zu Methode 1, die durch Integrieren der Peakfläche die Bestimmung der Gesamtmenge  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  des Ansatzes erlaubt, kann man bei dieser Methode die fortlaufenden  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktionsraten über die Reaktionszeit (meist angegeben in Sekunden) bestimmen. Für die Bestimmung der maximalen Umsatzrate des Reaktionsansatzes ( $= V_{\text{maxTest}}$ ) wird am Scheitelpunkt der Kurve das Integral über den Zeitraum von 5 sec vor und nach dem Scheitelpunkt ermittelt ( $=$  in 10 sec gebildetes  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ ) und auf die Produktion für eine Sekunde umgerechnet.  $V_{\text{maxTest}}$  in dem gegebenen Beispiel (Abb. 14) beträgt  $1,6 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ . Außerdem wird die Zeit bis zum Erreichen von  $V_{\text{maxTest}}$  in die Auswertung einbezogen und als Lag-Phase  $V_{\text{maxTest}}$  bezeichnet. Bei diesem Beispiel beträgt die Lag-Phase 38 sec.

### 3.2 Gegenüberstellung von abiotischer und biotischer Bismut-Methylierung in Gegenwart von Methylcobalamin

Da Bismut abiotisch – wenn auch in wesentlich geringerem Ausmaß als biotisch – methyliert werden kann, werden in den Abschnitten 3.2.1 – 3.2.3 zunächst die Bedingungen und Abhängigkeiten dieser abiotischen Reaktionen dargestellt, um in den Abschnitten 3.5 – 3.8 ausführlich die Ergebnisse der weitaus effizienteren biotischen Bismut-Methylierung darzustellen.

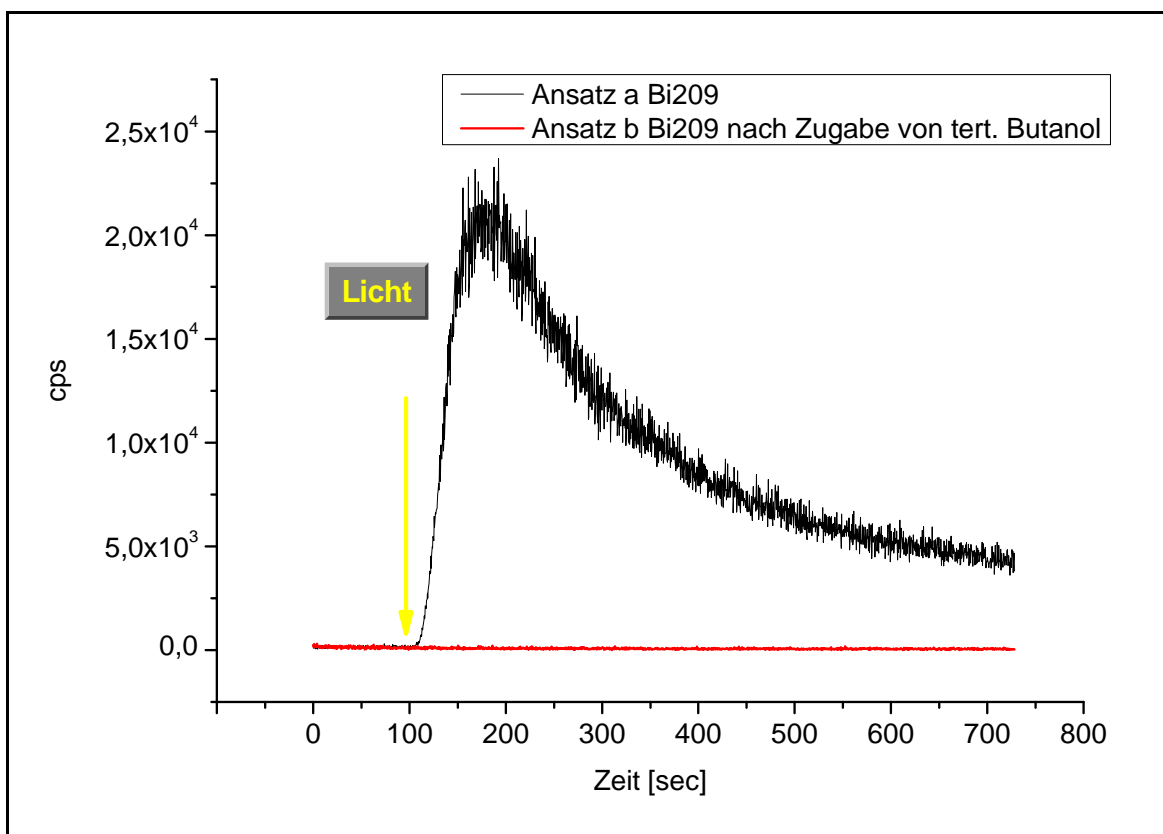
Für die abiotische Methylierung von Metallen scheinen insbesondere drei Reaktionswege verantwortlich zu sein:

- 1.) Transmethylierung (Übertragung von einem zum anderen Metall(oid)) unter verschiedenen abiotischen Bedingungen (Salinität, pH-Wert, etc.) z. B. bei As, Blei, Selen, Quecksilber, Zink und Zinn, wobei eine Reihe verschiedener Methylendonoren in Betracht kommt, wie z. B.  $(\text{CH}_3)_n\text{Sn}$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+$ ,  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ,  $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  (Gunsalus *et al.* 1978b; Fergusson 1991; Mayer *et al.* 1992; Zakharyan *et al.* 1999; Amouroux *et al.* 2000; Pergantis *et al.* 2004; Celo *et al.* 2006; Chen *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Nakamura *et al.* 2009)
- 2.) Methylierung durch Methylgruppen, die fotochemisch aus metallorganischen Molekülen entstehen, wie z. B.  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ,  $(\text{Alkyl})_4\text{Pb}$ ,  $(\text{Alkyl})_4\text{Sn}$  (Craig 1986).
- 3.) Methylierung durch Methylradikale, die durch fotochemisch induzierte Homolyse aus  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  entstehen, z. B. Zinn (Malinovsky *et al.* 2009).

Um die Bedeutung biotischer Komponenten bei der Methylierung von Bismut zu dokumentieren, werden im Folgenden vergleichende Untersuchungen zur Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  in Gegenwart und Abwesenheit von Rohextrakten aus *M. mazei*-Zellen dargestellt.

#### 3.2.1 Abiotische $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung unter Lichteinfluss

Wie in der Literatur mehrfach belegt, werden bei starker Lichteinstrahlung Methylgruppen als Methylradikale von MeCob abgespalten (Yamada, *et al.* 1966; Yamada, *et al.* 1966; Pratt, 1971 *et al.*; Hogenkamp, 1966). Um zu prüfen, ob Bi-Ammoniumcitrat über diesen radikalischen Mechanismus methyliert werden kann, wurde der Reaktionsansatz (2000  $\mu\text{M}$  MeCob, 5  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat) in Abwesenheit (Ansatz a) und Gegenwart (Ansatz b) von 50 mM tertiärem (= tert.) Butanol als Radikalfänger 100 sec mit einer 125 W Halogenlampe bestrahlt und die Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  mittels ICP-MS-Analytik (Methode 2 ,online') verfolgt (Abb. 15):



**Abb. 15** Verlauf der abiotischen Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  nach Belichtung. Die Ansätze wurden in Abwesenheit und in Gegenwart des Radikalfängers tert. Butanol durchgeführt. Zusammensetzung der Reaktionsansätze: Ansatz a): 2000  $\mu\text{M}$  MeCob und 5  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat in 50 mM Hepes pH 7,0; Start durch Zugabe von MeCob, nach 100 sec Belichtung mit einer 125 W Halogenlampe bis zum Ende der Messung Ansatz b): wie a) aber zusätzliche Zugabe von 50 mM tert. Butanol (Endkonzentration: 50mM) zum Start.

In Abb. 15 ist deutlich zu erkennen, dass die Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  im abiotischen *in vitro*-Ansatz ohne tert. Butanol durch Licht induziert wird.  $V_{\text{maxTest}}$  von  $0,14 \text{ pmol sec}^{-1}$  wird nach einer Lag-Phase von ca. 70 sec nach Beginn der Belichtung erreicht (s. Ansatz a). Zugabe von tert. Butanol als Radikalfänger zum Start des Ansatzes verhindert die Produktion von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  (s. Ansatz b) und deutet auf einen radikalischen Mechanismus der Bi-Methylierung durch Licht in Gegenwart von MeCob hin.

### 3.2.2 Abiotische $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung in Gegenwart von Titan(III)Citrat (TiCit)

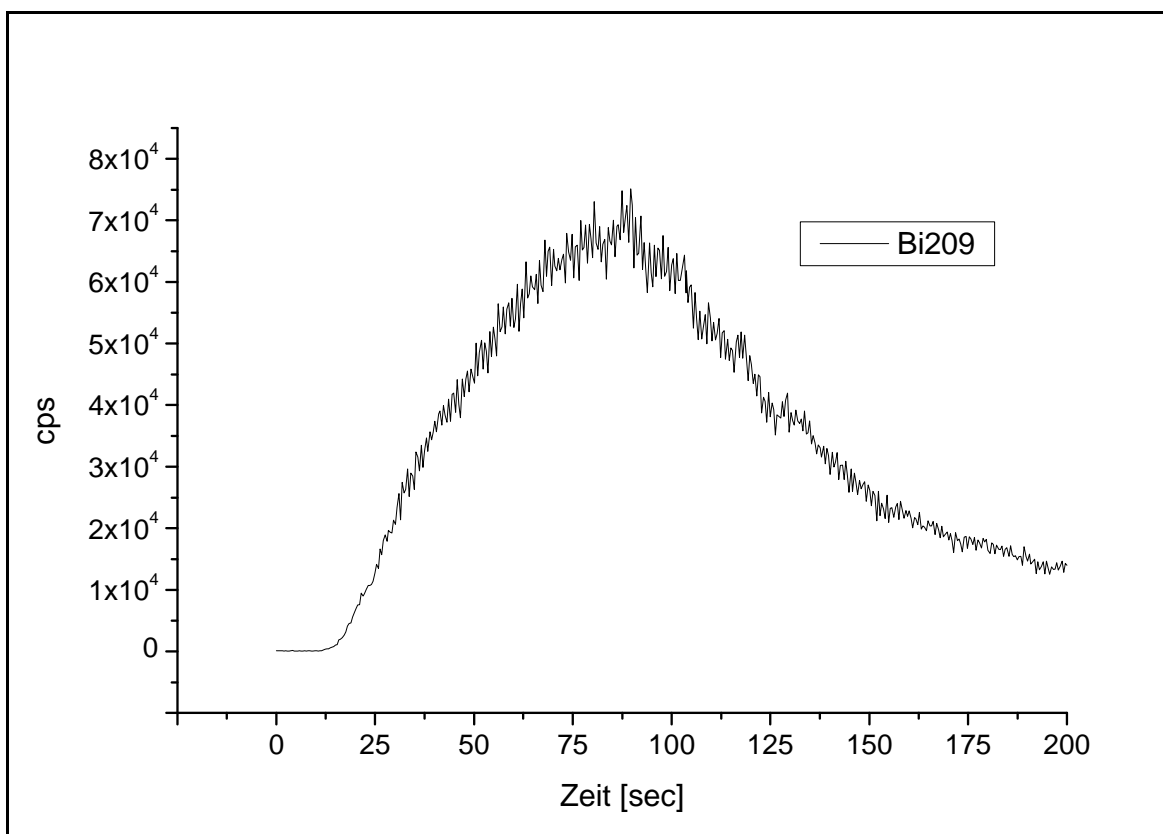
In weiteren Ansätzen wurde geprüft, inwieweit Bismut bei stark negativen Redoxpotenzialen abiotisch methyliert werden kann. Dazu wurden *in vitro*-Ansätze in Gegenwart von TiCit ( $E^0 - 480 \text{ mV}$  (Zehnder *et al.* 1976)) angesetzt. TiCit wird als starkes Reduktionsmittel zur Stabilisierung von Cob(I) ( $E^0 - 600 \text{ mV}$  (Lexa *et al.* 1977; Dryhurst

1982; Lexa *et al.* 1983)) in Tests zur Charakterisierung der Enzymaktivität heterolog exprimierter MtaA und MtbA aus *M. barkeri* eingesetzt (Sauer *et al.* 1998; Sauer *et al.* 1999).

Die abiotischen Reaktionsansätze mit 5  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat in 50 mM Hepes pH 7,0 wurden durch Zugabe von 2000  $\mu\text{M}$  MeCob gestartet und die Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  mittels ,online'-ICP-MS-Analytik verfolgt. Nach 20 sec wurde TiCit in steigenden Konzentrationen zugegeben (Endkonzentrationen: 500 – 2000  $\mu\text{M}$ ). In Parallelansätzen wurde tert. Butanol zugesetzt, um die Wirkung dieses Radikalfängers zu prüfen (Endkonzentration 50 mM) (s. Tab. 18).

**Tab. 18**      *Einfluss unterschiedlicher TiCit-Konzentrationen (ohne und mit tert. Butanol) auf die  $V_{\max\text{Test}}$  [ $\text{pmol sec}^{-1}$ ] und die Lag-Phase [sec] in abiotischen in vitro-Bismut-Methylierungs-Assays*

	$V_{\max\text{Test}} \pm \sigma$ [ $\text{pmol sec}^{-1}$ ]	Lag-Phase $V_{\max\text{Test}} \pm \sigma$ [sec]
500 $\mu\text{M}$ TiCit	$7,6 \pm 1,7$	$106,8 \pm 23,9$
1000 $\mu\text{M}$ TiCit	$7,9 \pm 0,4$	$84,0 \pm 8,5$
1500 $\mu\text{M}$ TiCit	$7,8 \pm 0,4$	$85,5 \pm 3,4$
2000 $\mu\text{M}$ TiCit	$7,3 \pm 0,8$	$86,0 \pm 7,1$
500 $\mu\text{M}$ TiCit+50 mM tButOH	$4,3 \pm 0,6$	$263,3 \pm 19,4$



**Abb. 16** Verlauf der abiotischen Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  nach Zugabe von  $1000 \mu\text{M}$  TiCit. Der Reaktionsansatz mit  $50 \text{ mM}$  Hepes pH7,0 und  $5 \mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat wurde im Dunkeln durch Zugabe von MeCob (Endkonzentration  $2000 \mu\text{M}$ ) gestartet; nach  $20 \text{ sec}$  wurde TiCit zugegeben.

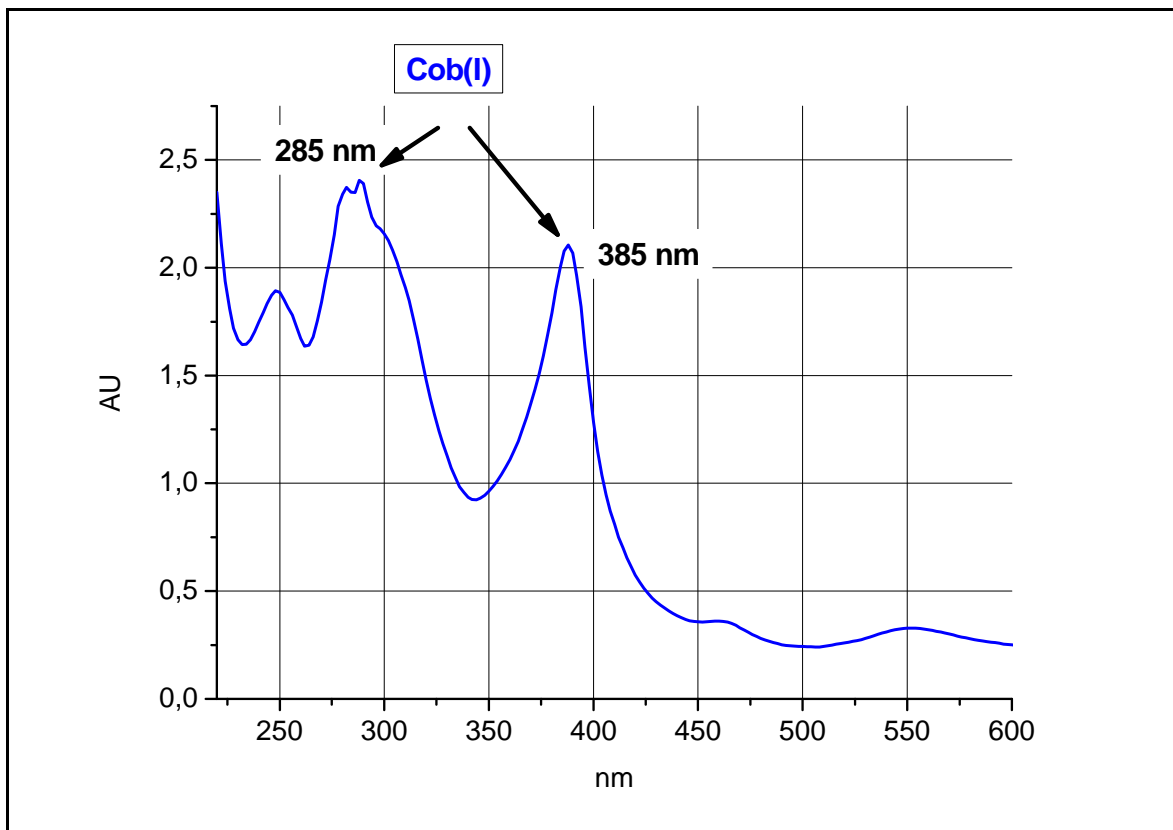
Aus Tab. 18 ist zu erkennen, dass die Zugabe von TiCit weitgehend konzentrationsunabhängig die schnelle Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  bewirkt.  $V_{\text{maxTest}}$  wird nach einer Lag-Phase von  $\sim 90 \text{ sec}$  erreicht und beträgt  $\sim 7,5 \text{ pmol sec}^{-1}$ .

Abb. 16 zeigt exemplarisch den Verlauf der abiotischen Reaktion bei einer Konzentration von  $1000 \mu\text{M}$  TiCit.

### 3.2.3 Abiotische $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung durch Cob(I)

Der vorangegangene erfolgreiche Versuch Bi-Ammoniumcitrat in Gegenwart des Reduktionsmittels TiCit zu  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  umzusetzen, legte den Schluss nahe, dass auch Cob(I), dessen Redoxpotenzial mit  $E^0 = -600 \text{ mV}$  noch negativer ist als das des TiCit ( $E^0 = -480 \text{ mV}$ ), in der Lage sein könnte, unter abiotischen Bedingungen die Transmethylierung zu induzieren. Cob(I) war deswegen ein interessantes Untersuchungsobjekt, da es biotisch im Lauf der Methanogenese bei der Transmethylierung von Methylcobalamin auf CoM durch die MtbA entsteht, deren Methylierungspotenzial im Zuge dieser Arbeit untersucht werden soll. Sollte Cob(I) in der

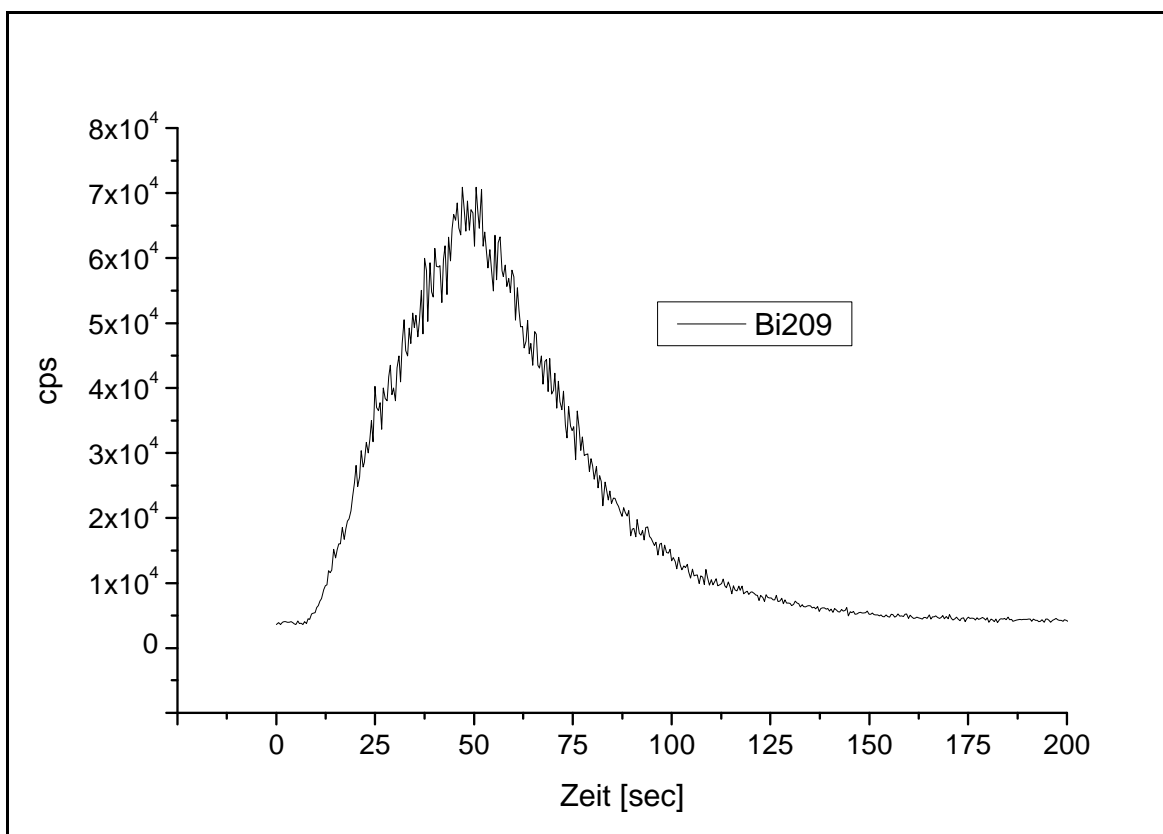
Lage sein, die abiotische Bismut-Methylierung zu induzieren, wäre das ein wichtiger Hinweis auf den Mechanismus, der der biotischen Bismut-Methylierung zugrunde liegt. Cob(I) wurde über elektrochemische Reduktion aus Aquocobalamin hergestellt (Würfel, unveröffentlicht modifiziert nach (Kreft *et al.* 1994)). Das Cob(I)-Präparat für die Versuche wurde mir freundlicherweise von Herrn O. Würfel (AG Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt. Das für Cob(I) typische Profil des UV/VIS-Spektrums mit den charakteristischen Absorptionsmaxima bei 285 und 385 nm belegt eindeutig die Homogenität des Präparates (Abb. 17).



**Abb. 17** UV/VIS-Spektrum des durch elektrochemische Reduktion aus Aquocobalamin hergestellten Cob(I).

Die Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  in Abhängigkeit von Cob(I) sollte mittels ICP-MS-,online'-Messungen in abiotischen Ansätzen getestet werden. Die Ansätze enthielten 5  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat und 260  $\mu\text{M}$  MeCob in 50 mM Hepes pH 7,0 (Reaktionsstart-Mix) und 500  $\mu\text{M}$  Cob(I).

Cob(I) wurde im Anaerobenzelt vorgelegt und der Reaktionsstart-Mix wurde zum Start der Messung zugegeben. Die Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  wurde ,online' verfolgt und ist Abb. 18 grafisch dargestellt.



**Abb. 18**  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung in einem abiotischen *in vitro*-Bismut-Methylierungs-Ansatz mit 500  $\mu\text{M}$  Cob(I) ( $n = 3$ ). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Reaktionsstart-Mix aus 5  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat und 260  $\mu\text{M}$  MeCob in 50 mM Hepes pH 7,0 zu Cob(I) gestartet.

In Abb. 18 ist zu erkennen, dass die Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  nahezu unmittelbar nach Zugabe des Reaktionsstart-Mix zu Cob(I) beginnt.  $V_{\text{maxTest}}$  ist nach einer Lag-Phase von 47 sec erreicht.

Sowohl bei den Ansätzen mit TiCit als auch mit Cob(I) bewirkt die Zugabe von tert. Butanol, dass die max. Rate später erreicht wird und nur noch halb so hoch ist, was bedeuten könnte, dass die Übertragung der Methylgruppen teilweise radikalisch erfolgt, oder dass tert. Butanol die Wirkung von TiCit bzw. Cob(I) auf anderem Wege hemmt.

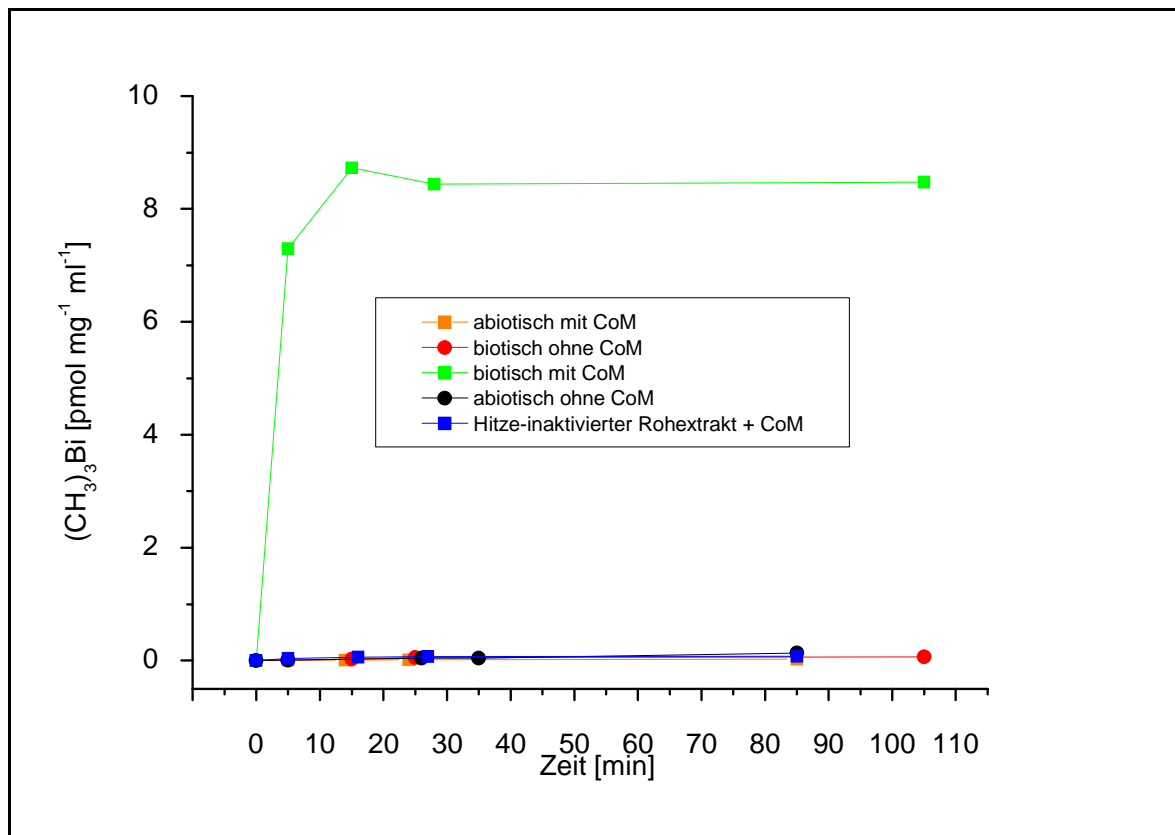
### 3.2.4 Gegenüberstellung von biotischer und abiotischer $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion: Die zentrale Bedeutung von CoM

Für die hier durchgeführten Versuche zur Produktionsanalyse von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  wurde die ‚Purge and Trap‘-Methode verwendet (siehe 2.2.4.2), wobei längere Reaktionszeiten (2 - 110 min) berücksichtigt wurden. Die jeweiligen (generell unter anaeroben Bedingungen durchgeführten) Ansätze (1 ml Gesamtvolumen) enthielten neben dem

Reaktionspuffer (50 mM Hepes, pH 7,0), 750  $\mu\text{M}$  MeCob und 10  $\mu\text{M}$  Bismut-Ammonium-Citrat.

Die Ansätze wurden in Anwesenheit von dialysiertem *M. mazei*-Rohextrakt (500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) (biotischer Ansatz) bzw. Abwesenheit (abiotischer Ansatz) durchgeführt. Außerdem wurden biotische und abiotische Ansätze mit und ohne CoM und Ansätze mit Hitze-inaktiviertem Rohextrakt gemessen. Der Start der Reaktion erfolgte über die Zugabe von MeCob. Nach verschiedenen Zeiten wurden jeweils 1-ml-Aliquots der Gasphase entnommen und die  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Menge analysiert.

In Abb. 19 sind die Ergebnisse der Versuche grafisch dargestellt.



**Abb. 19** Vergleich der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion [ $\text{pmol mg}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  Gasphase] in biotischen und abiotischen Reaktionsansätzen mit CoM (1500  $\mu\text{M}$ ) und ohne CoM sowie in einem Ansatz mit Hitze-inaktiviertem Rohextrakt. Aufgetragen sind die Zeitpunkte der Probennahme [min] gegen die Menge an  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  [ $\text{pmol je ml der Gasphase}$ ]. Alle Ansätze enthielten jeweils 10  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat und wurden durch Zugabe von MeCob (Endkonzentration 750  $\mu\text{M}$ ) gestartet. Die biotischen Ansätze enthielten 600  $\mu\text{g ml}^{-1}$  dialysierten Rohextrakt von *M. mazei*. Jeweils 1-ml-Aliquots der Gasphase entnommen und auf ihren  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Gehalt analysiert.

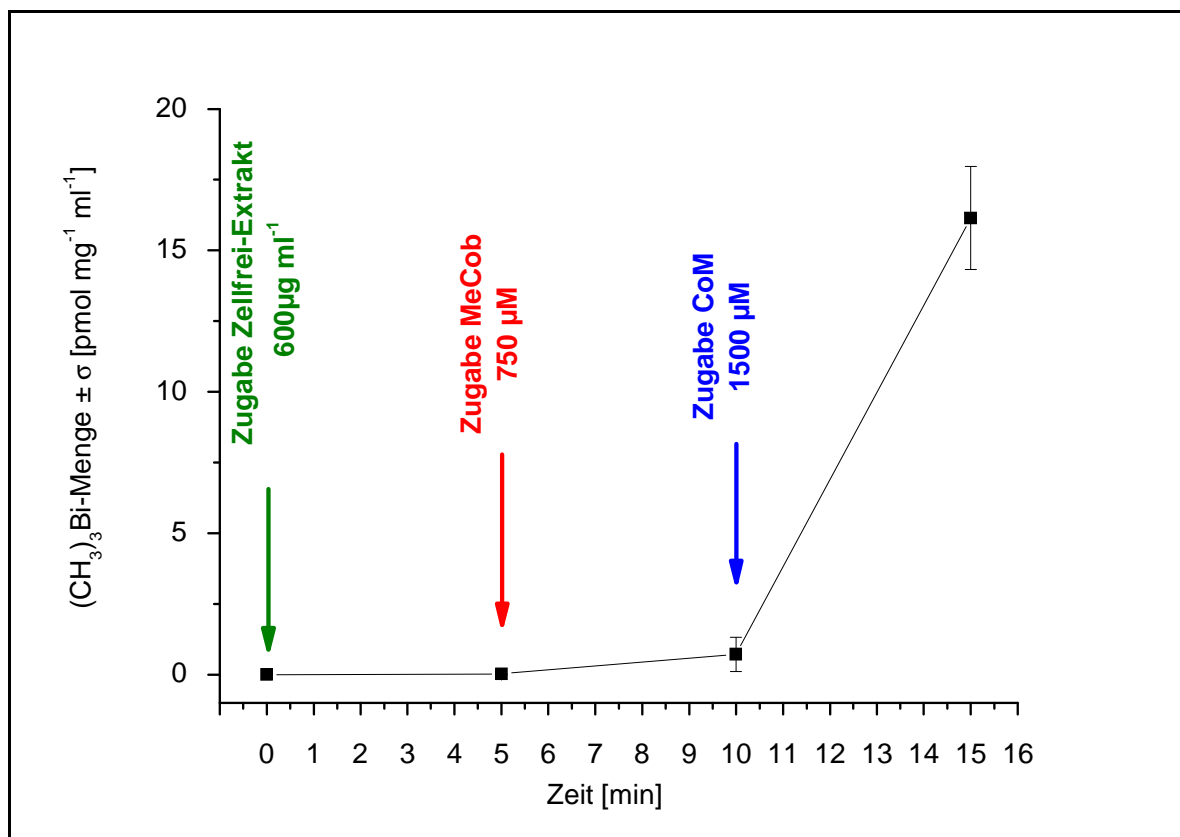
Wie in Abb. 19 dargestellt, lässt sich bezüglich der Wirkung von CoM auf die Bismut-Methylierung ein deutlicher Unterschied zwischen den biotischen und den abiotischen Ansätzen erkennen: Während CoM eine deutliche Förderung der Produktion von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  in den biotischen Ansätzen hervorruft, ist im Fall der abiotischen Ansätze kein Einfluss zu



erkennen. Die fördernde Rolle von CoM in den biotischen Ansätzen unterstützt die Annahme einer unmittelbaren oder mittelbaren Beteiligung von CoM-umsetzenden Enzymen an der Bi-Methylierung, die ja auch im Rohextrakt in den biotischen Ansätzen vorliegen sollten.

Hitze-Inaktivierung des Rohextraktes (in Gegenwart von CoM) führt zu einem Verlust der Bismut-Methylierungsfähigkeit. Die in diesen Ansätzen gebildete Menge  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  entspricht der Produktion des abiotischen Ansatzes.

Die essenzielle Bedeutung von CoM für die Bi-Methylierung in den biotischen Ansätzen wird auch durch die schrittweise Zugabe der Reaktanten belegt (Abb. 20). Wie die Grafik zeigt, erfolgt die Produktion von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  erst nachdem CoM zu der Mischung aus Rohextrakt, Bi-Ammoniumcitrat und MeCob zugegeben wurde.



**Abb. 20** Schrittweise Zugabe der benötigten Reaktanten zu einem biotischen Bismut-Methylierungs-Ansatz ( $n = 3$ ). Der Ansatz enthielt 50 mM Hepes pH 7,0 und 10  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Nach Zugabe von dialysiertem Rohextrakt (Endkonzentration 600  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) zum Zeitpunkt 0 und MeCob (Endkonzentration 750  $\mu\text{M}$ ) nach 5 min ist fast keine  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion zu erkennen. Erst nach Zugabe von CoM (Endkonzentration 1500  $\mu\text{M}$ ) 10 min nach Reaktionsstart erfolgt eine nachweisbare  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion (hier: 15  $\text{pmol mg}^{-1} \text{ml}^{-1}$   $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  in 5 min).

### **3.3 Anreicherung der Bismut-methylierenden Proteinfraktion aus Rohextrakt von *M. mazei***

Die Bismut-methylierende Proteinfraktion wurde durch verschiedene Chromatografie-Verfahren aus Rohextrakt von *M. mazei* angereichert (siehe 2.2.3.1). Die methylierungsaktiven Fraktionen der jeweiligen Reinigungsschritte wurden über die Methode ‚Purge and Trap‘ (siehe 2.2.4.2) identifiziert. Im Folgenden sind die einzelnen Abschnitte der Anreicherung zusammengefasst:

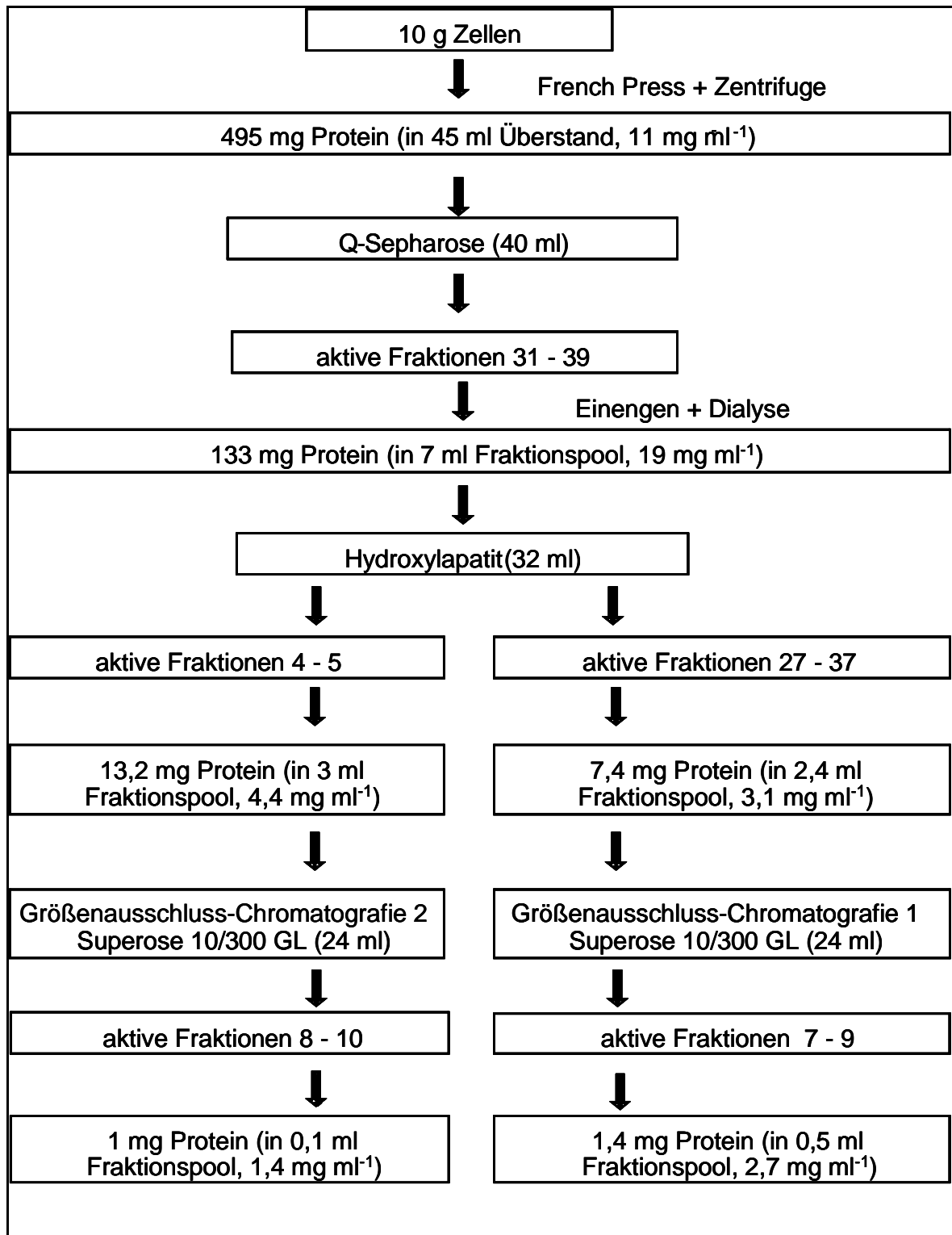
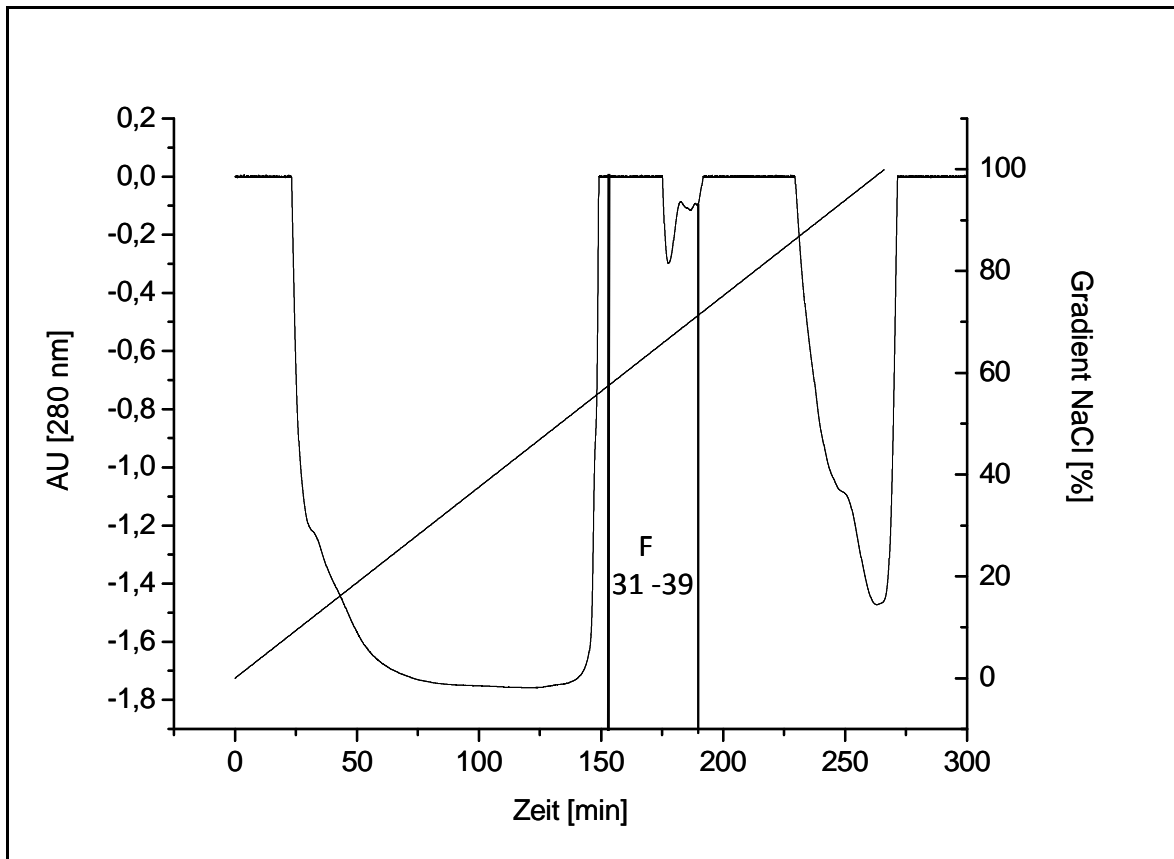
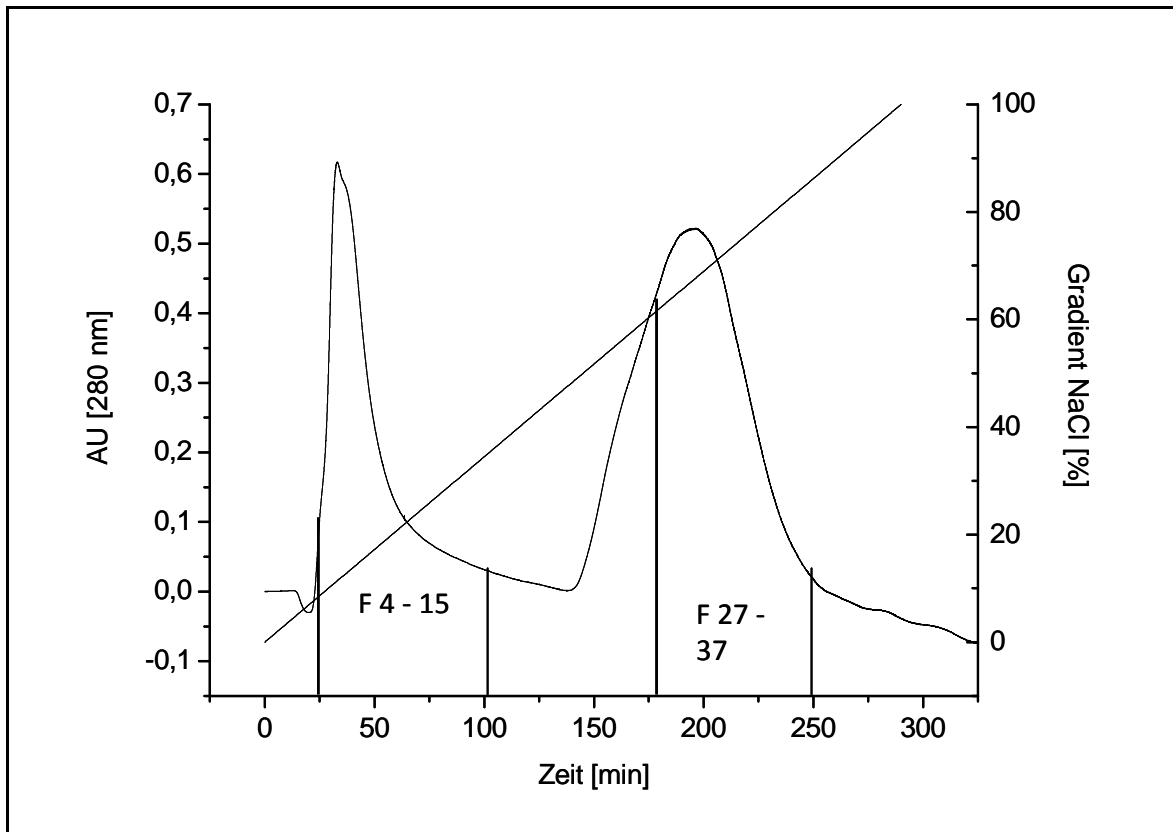


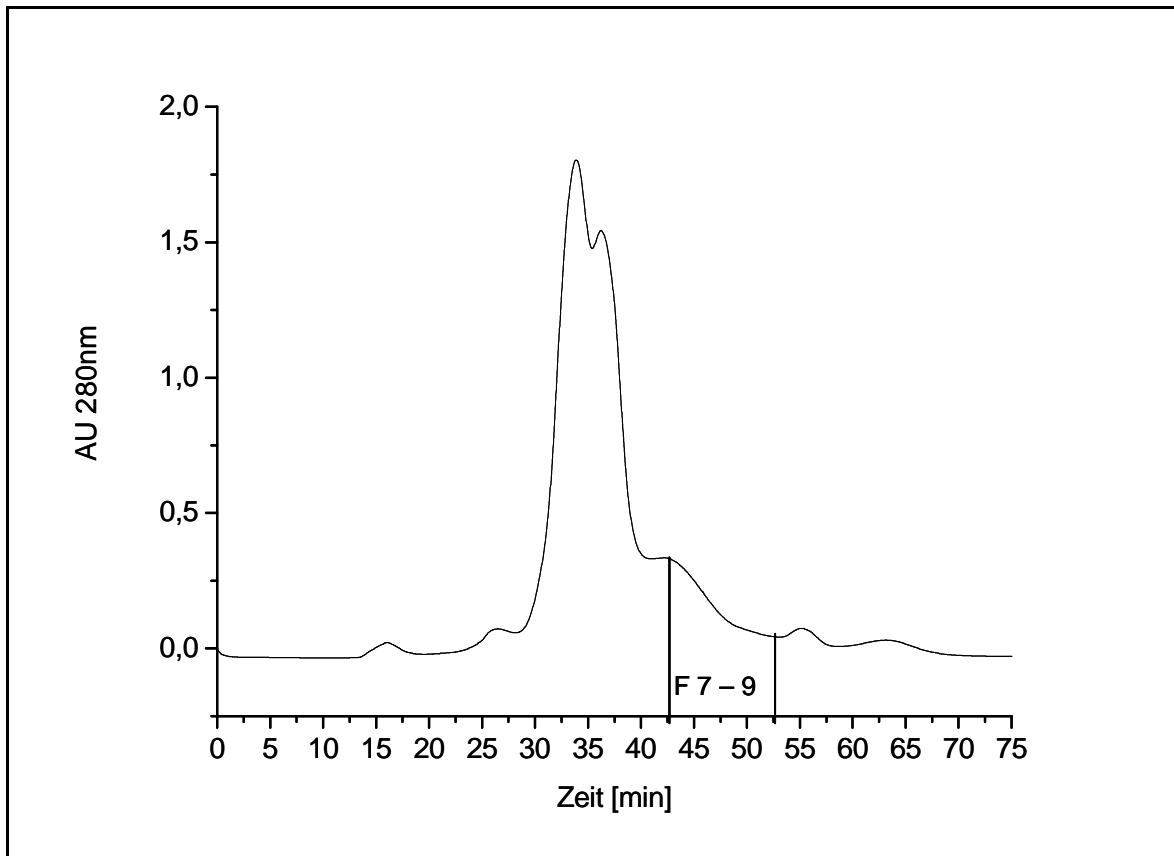
Abb. 21 Schematische Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte zur Anreicherung der Bismut-methylierenden Proteinfraction aus Rohextrakt von *M. mazei*



**Abb. 22** Chromatogramm der Q-Sepharose-Chromatografie zur Anreicherung der Bismut-methylierenden Proteinfraction. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten (0 – 1 mM NaCl in 50 mM Hepes pH7,0). Die methylierenden Fraktionen 31 – 39 eluierten bei NaCl-Konzentrationen zwischen 580 und 730 mM.



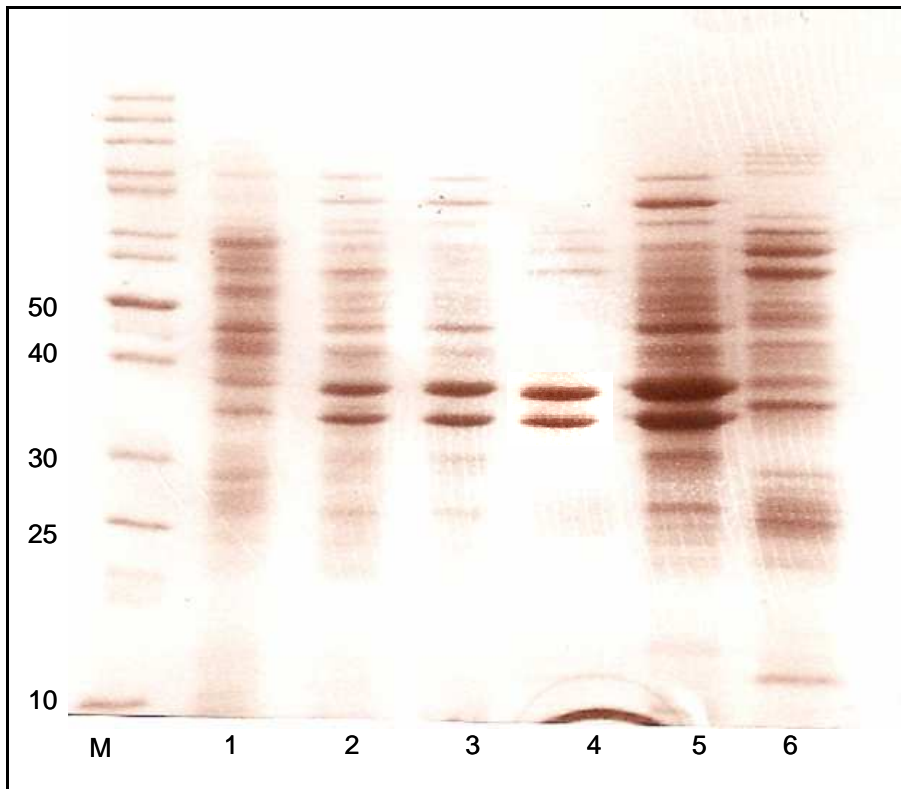
**Abb. 23** Chromatogramm der Hydroxylapatit-Chromatografie zur Anreicherung der Bismut-methylierenden Proteinfraction. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten (0 – 1 mM NaCl in 50 mM Hepes pH7). Die methylierenden Fraktionen 4 - 15 eluierten bei NaCl-Konzentrationen zwischen 90 und 330 mM, die Fraktionen 27 – 37 NaCl-Konzentrationen zwischen 590 und 810 mM.



**Abb. 24** Chromatogramm der Größenausschluss-Chromatografie 1. Die methylierenden Fraktionen 7 – 9 weisen Proteine mit einer theoretischen molekularen Masse von 39,8 bzw. 10 kDa (vergl. Eichgerade Superose 10/300 GL (s. 2.2.3.1)).

Die methylierenden Fraktionen 31 – 39 der Q-Sepharose-Chromatografie eluierten bei NaCl-Konzentrationen von 581 – 731 mM. Von der Hydroxylapatit-Chromatografie eluierten die Fraktionen 4 – 15 bei 88 – 328 mM NaCl und die Fraktionen 27 – 37 bei 590 – 809 mM. Über die Eichgerade für die Superose 10/300 GL Size-Exclusion-Chromatografie konnte abgeleitet werden, dass die molekulare Masse der Proteine in den methylierenden Fraktionen der 1. Chromatografie zwischen 10 und 40 kDa, die der 2. Chromatografie zwischen 5 und 20 kDa lagen.

Aliquots des Rohextraktes sowie aller Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, um die Zusammensetzung und Reinheit der einzelnen Proben beurteilen zu können (siehe Abb. 25). Es wurden jeweils Proben mit gleichen Proteinkonzentrationen (5 µg pro Geltasche) aufgetragen (F 4 – 15 nur 1 µg pro Geltasche, da die Proteinkonzentration dieser Fraktionen zu gering war).



**Abb. 25** SDS-PAGE-Gelelektropherogramm der Bismut-methylierenden Proteinfractionen aus *M. mazei* nach chromatografischer Auftrennung über Q-Sepharose-, Hydroxylapatit- und Größenausschluss-Chromatografie.

M: Proteinstandard 10 – 50 kDa

1: Rohextrakt *M. mazei*

2: Pool der methylierenden Fraktionen der Q-Sepharose-Chromatografie

3: Pool der methylierenden Fraktionen 4 – 15 der Hydroxylapatit-Chromatografie

4: Pool der methylierenden Fraktionen 27 – 37 der Hydroxylapatit-Chromatografie

5: Pool der methylierenden Fraktionen 7 – 9 der 1. Größenausschluss-Chromatografie

6: Pool der methylierenden Fraktionen 8 – 10 der 2. Größenausschluss-Chromatografie

In Abb. 25 treten besonders in den Spuren 2 – 5 zwei Banden hervor. Diese Proteine haben eine molekulare Masse von ca. 33 bzw. 36 kDa (vergl. Molekulargewichts-Marker M) und kämen bezüglich ihrer Größe als Kandidaten für die MtbA in Betracht. In der Spur 1 (Rohextrakt) des SDS-Gel-Elektropherogramms sind diese Banden nur schwach zu erkennen, in Spur 2 – 5 mit den angereicherten Fraktionen aus Q-Sepharose, Hydroxylapatit und der 1. Größenausschluss-Chromatografie treten sie dagegen deutlich hervor.

Die 2. Größenausschluss-Chromatografie (Spur 6) zeigt ein abweichendes Bandenmuster der aktiven Fraktionen und beinhaltet eventuell andere Bi-methylierende Enzyme von *M. mazei*.

Weitere Versuche, die beiden in der 1. Größenausschluss-Chromatografie deutlich angereicherten Proteine präparativ aufzutrennen, blieben erfolglos.

### **3.4 Heterologe Expression und Reinigung der MtbA (orf 1439) aus *M. mazei***

Auch wenn die Versuche zur Isolierung eines Bi-methylierenden Enzymes aus *M. mazei* nicht restlos zufriedenstellend waren, machten sie es dennoch wahrscheinlich, dass in diesem Organismus MeCob/CoM-abhängige Enzyme vorliegen, die die Umsetzung Bi-Ammoniumcitrat zu  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  katalysieren können.

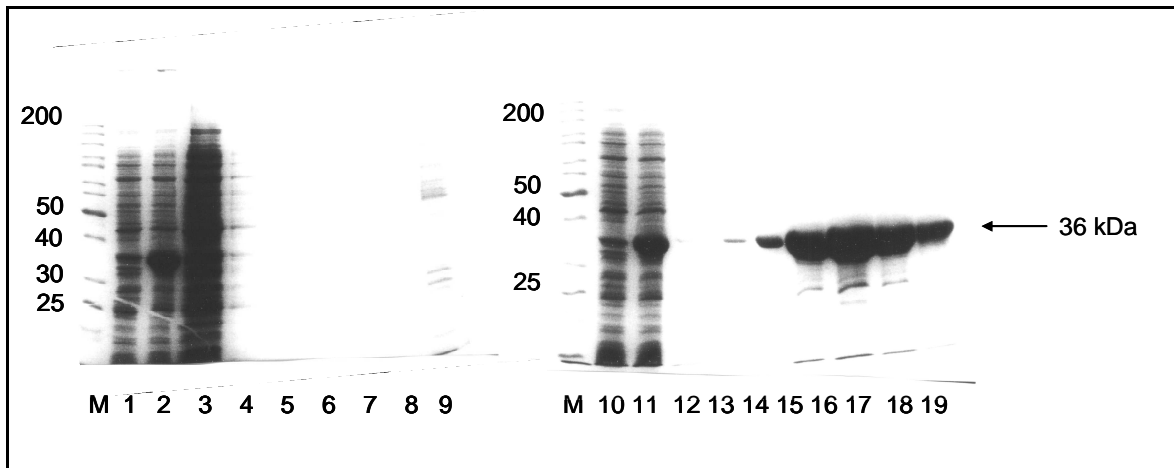
Um den Nachweis zu führen, dass – wie vermutet – die MtbA Bismut-Methylierungsaktivität besitzt, wurde die heterologe Expression dieses Enzyms angestrebt, um dessen Eigenschaften näher untersuchen zu können. Die Wahl fiel auf die MtbA (orf 1439). Für diese Methyltransferase von *M. barkeri* ist bekannt, dass sie den Methylgruppentransfer nicht nur von Protein-gebundenen Corrinoiden, sondern auch von freiem MeCob auf CoM vermitteln kann (Ferguson et al. 1996) und damit experimentelle Vorteile bietet.

#### **3.4.1 Heterologe Expression und Anreicherung der MtbA orf 1439 mit C-terminalem His-tag aus *M. mazei* in *E. coli* Rosetta (DE3)**

Das Gen der MtbA orf 1439 aus *M. mazei* wurde mit 50 ng Template-DNS und den konstruierten, spezifischen Primern (siehe 2.2.2.5) mittels PCR unter Verwendung der *pfu*-Polymerase amplifiziert. Mit Hilfe des revers-komplementären Primers wurde am C-terminalen Ende des Proteins ein 6-His-tag eingefügt, um die Reinigung des Enzyms zu erleichtern. Das kodierende Gen wurde in den Vektor pET 15b kloniert. Zur Kontrolle wurde die multiple-cloning-site des rekombinanten Vektors sequenziert. Nach Transformation des Vektors in *E. coli* Rosetta DE3 wurde das rekombinante Enzym in einem 6 l Expressionsansatz exprimiert (siehe 2.2.1.2).

Nach Zellaufschluss und Zentrifugation (siehe 2.2.1.2) wurden die Proteine des Rohextraktes über eine Ni-NTA Säule chromatografisch aufgetrennt. Die genauen Bedingungen der Chromatografie sind unter 2.2.3.2 beschrieben. Zur Analyse wurden die Proteine der verschiedenen Fraktionen Gel-elektrophoretisch aufgetrennt.





**Abb. 26** SDS-PAGE-Elektropherogramm der Fraktionen nach Ni-NTA Chromatografie mit Rohextrakt von rekombinanten *E. coli*-Zellen, die die archaeale Methyltransferase MtbA orf 1438 von *M. mazei* mit C-terminalem His-tag überexprimiert haben.

- M: Proteinstandard (25 – 200 kDa)  
 1: Rohextrakt *E. coli* vor Induktion mit IPTG  
 2: Rohextrakt *E. coli* nach Induktion mit IPTG  
 3: Säulendurchlauf  
 4 – 10: Fraktionen 9 – 14  
 11: Rohextrakt *E. coli* vor Induktion mit IPTG  
 12: Rohextrakt *E. coli* nach Induktion mit IPTG  
 13 – 20: Fraktionen 15 – 19

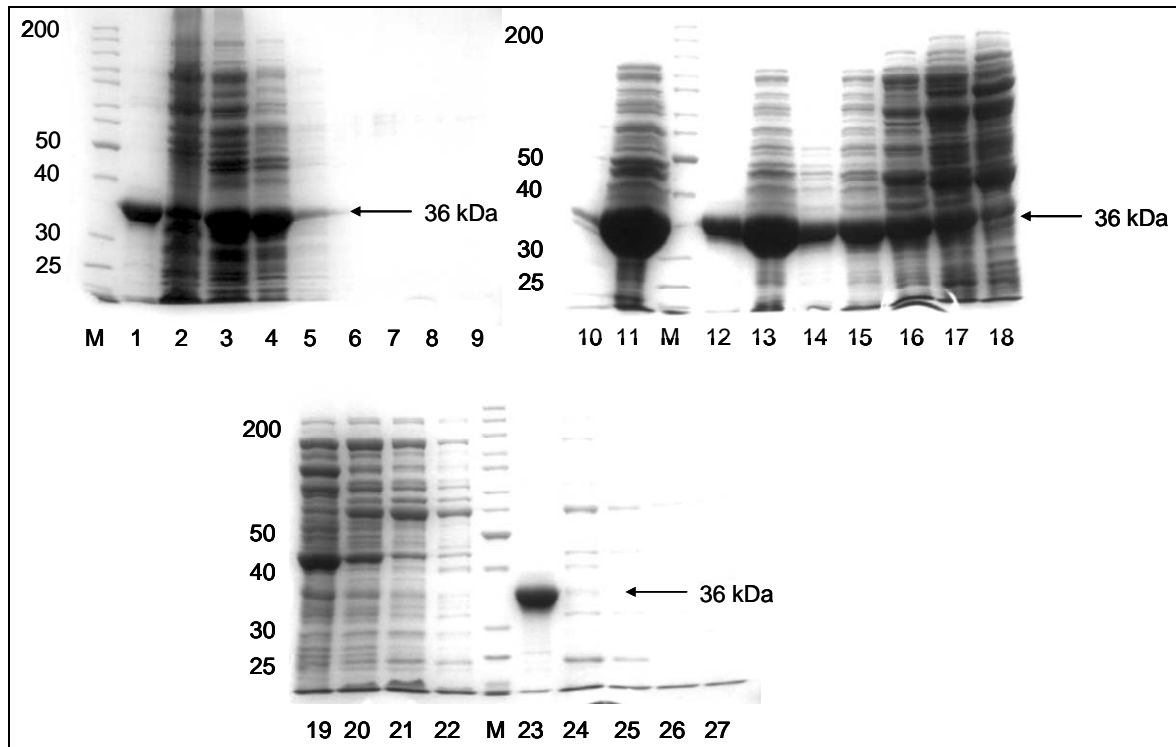
In den Spuren 1 und 2 sowie 10 und 11 ist deutlich zu erkennen, dass sich im Rohextrakt von *E. coli* nach Induktion mit IPTG ein Protein mit einer molekularen Masse von ~ 36 kDa anreichert, die der theoretischen Masse der MtbA von 36,6 kDa sehr gut entspricht.

Die rekombinante MtbA fand sich dominant in den Fraktionen 15 – 19 der Ni-NTA-Chromatografie und eluierte somit bei Imidazol-Konzentrationen zwischen 136,5 und 234 mM. Zur weiteren Anreicherung wurden die Fraktionen 15 bis 19 mittels Membranfiltration (Vivaspin, Ausschlussgrenze 10 kDa) auf ein Volumen von 2 ml eingengt. Anschließend wurde die Proteinlösung über Nacht gegen 50 mM Hepes, pH 7,0 bei 4 °C dialysiert. Die Proteinkonzentration des dialysierten Konzentrats betrug 19 mg ml<sup>-1</sup>. Die Gesamtausbeute betrug 38 mg.

### 3.4.2 Heterologe Expression und Anreicherung der MtbA orf 1439 ohne C-terminalen His-tag aus *M. mazei* in *E. coli* Rosetta (DE3)

Da Histidin Metallionen-komplexierende Eigenschaften aufweist und somit auch Bismutationen binden könnte, war es nötig zu testen, ob und wenn ja inwieweit, der 6-His-tag Einfluss auf die Bismut-Methylierungsaktivität des rekombinanten Proteins hat. Das Gen der MtbA orf 1439 aus *M. mazei* wurde mit 50 ng Template-DNS und den synthetisierten, spezifischen Primern (siehe 2.2.2.5) mittels PCR unter Verwendung der *pfu*-Polymerase amplifiziert und in den Vektor pET 15b kloniert. Nach Transformation des Vektors in *E. coli* Rosetta DE3 wurde das rekombinante Enzym wie im Fall der MtbA mit C-terminalem His-tag in einem 6 l Expressionsansatz exprimiert (siehe 2.2.1.2).

Nach Zellaufschluss und Zentrifugation (siehe 2.2.1.2) wurden 4 ml des zellfreien Extraktes (Proteinkonzentration des Überstandes: 22,5 mg ml<sup>-1</sup>) auf eine 6 ml Q-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Chromatografie-Läufe wurde unter den in 2.2.3.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt und die Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert.



**Abb. 27** SDS-PAGE-Gelelektropherogramm der Fraktionen nach Q-Sepharose-Chromatografie mit Rohextrakt von rekombinanten *E. coli*-Zellen, die die archaeale Methyltransferase MtbA orf 1438 ohne His-tag von *M. mazei* überexprimiert haben. Zur Größenabschätzung des angereicherten Proteins wurde zusätzlich zum Proteinstandard ein Aliquot der rek. MtbA mit C-terminalem His-tag aufgetragen.

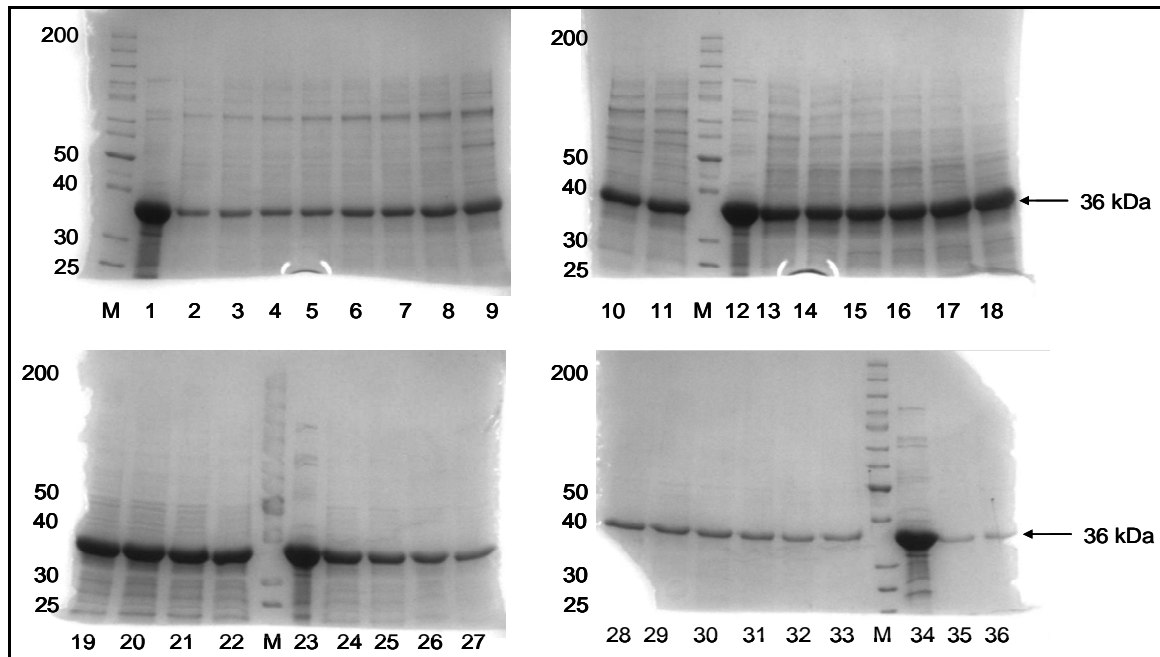
- M: Proteinstandard (25 – 200 kDa)
- 1: rek. MtbA orf 1439 mit His-tag
- 2 – 6: Durchlauf, Fraktionen 3 – 6
- 7 – 9: Fraktionen 9 – 12
- 10 + 11: Fraktionen 13 + 14
- 12: rek. MtbA orf 1439 mit His-tag
- 13 – 18: Fraktionen 15 – 20
- 19 – 22: Fraktionen 21 – 24
- 23: rek. MtbA orf 1439 mit His-tag
- 24 – 27: Fraktionen 25 – 28

Der größte Teil der rekombinanten MtbA eluierte bei 273 – 370 mM NaCl (Fraktionen 14 - 19; vergl. Spur 1 = rek. MtbA mit His-tag).

Zur weiteren Anreicherung wurden die Fraktionen 4 und 5 des Durchlaufs sowie die Fraktionen 14 – 19 vereinigt und mit Hilfe von Membranfiltration (Vivaspin, Ausschlussgrenze 10 kDa) auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Anschließend wurde die Probe über Nacht gegen 50 mM Hepes, pH7,0 mit 300 mM NaCl (Laufpuffer für

Größenausschluss-Chromatografie) bei 4 °C dialysiert. Die Ausbeute dieses Reinigungsschrittes betrug 37,5 mg.

Zur weiteren Reinigung wurde die Probe auf eine 320 ml HiLoad 26/60 Superdex 200 Größenausschluss-Chromatographiesäule aufgetragen und die Chromatografie bei den unter 2.2.3.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.



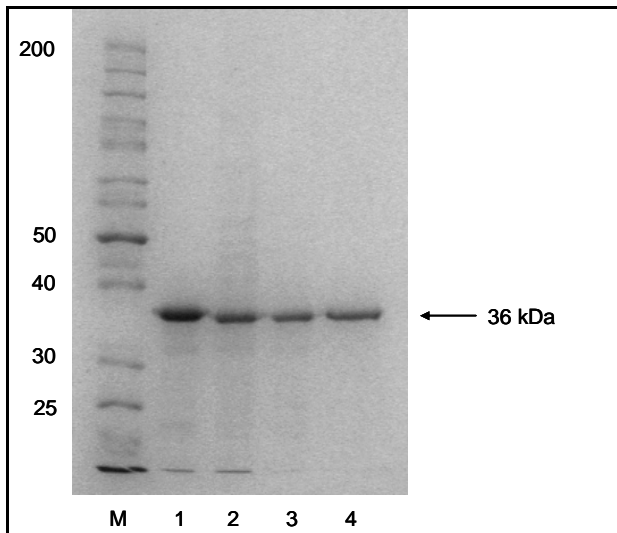
**Abb. 28 SDS-PAGE der Fraktionen nach Größenausschluss-Chromatografie mit Rohextrakt von rekombinanten *E. coli*-Zellen, die die archaeale Methyltransferase MtbA orf 1438 ohne His-tag von *M. mazei* überexprimiert haben. Zur Größenkontrolle wurde zusätzlich zum Proteinstandard ein Aliquot der rek. MtbA mit C-terminalem His-tag aufgetragen.**

- M: Proteinstandard (25 – 200 kDa)
- 1: MtbA orf 1439 mit His-tag
- 2 – 9: Fraktionen 44 – 51
- 10 + 11: Fraktionen 52 + 53
- 12: rek. MtbA orf 1439 mit His-tag
- 13 – 18: Fraktionen 54 – 59
- 19 – 22: Fraktionen 60 – 63
- 23: rek. MtbA orf 1439 mit His-tag
- 24 – 27: Fraktionen 64 – 68
- 28 – 33: Fraktionen 69 – 74
- 34: rek. MtbA orf 1439 mit His-tag
- 35 + 36: Fraktionen 75 + 76

Die Identifizierung des rekombinanten Enzymes in den Gel-Elektropherogrammen erfolgte über das Referenzprotein mit C-terminalem His-Tag sowie über die Größenbestimmung

mit Hilfe der Eichgerade für die Molekülgröße-Bestimmung über die HiLoad 26/60 Superdex 200 Säule (siehe 2.2.3.2). In den Fraktionen 54 bis 63 fand sich der größte Teil der rekombinanten MtbA. Allerdings waren in diesen Fraktionen auch noch massive Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine zu finden. In den Fraktionen 68 bis 76 lag das rekombinante Protein in deutlich höherer Reinheit allerdings auch in geringerer Konzentration vor. Die Fraktionen 44 bis 67 und 68 bis 76 wurden jeweils getrennt vereinigt und mittels Membranfiltration (Vivaspin, Ausschlussgrenze 10 kDa) auf ein Volumen von jeweils 1 ml eingeengt. Anschließend wurde die Probe über Nacht gegen 50 mM Hepes, pH 7,0 bei 4 °C dialysiert. Die Proteinkonzentration der dialysierten Konzentrate betrug für F 44 – 67 18 mg ml<sup>-1</sup> (5 ml) und für F 68 – 76 1,6 mg ml<sup>-1</sup> (in 1,5 ml). Insgesamt betrug damit die Ausbeute der rekombinanten MtbA ohne His-Tag 92,4 mg. Für die *in vitro*-Bismut-Methylierungs-Ansätze wurde der Fraktionspool F 68 – 76 verwendet.

Zum Vergleich der Reinheit der einzelnen Reinigungsfractionen wurden jeweils Aliquots mit gleicher Proteinkonzentration des Fraktionspools F 4 + 5 und 14 - 19 nach Q-Sepharose-Chromatografie sowie die beiden Fraktionspools nach Größenausschluss-Chromatografie in einer SDS-PAGE analysiert.



**Abb. 29** SDS-PAGE-Gelelektropherogramm der rek. MtbA mit C-terminalem His-tag (nach Ni-NTA-Chromatografie) und der einzelnen Reinigungsschritte (Q-Sepharose- und Größenausschluss-Chromatografie) der rek. MtbA ohne C-terminalem His-tag zum Qualitätsvergleich der Reinigungsfraktionen

M: Proteinstandard (25 – 200 kDa)

1: rek. MtbA mit C-terminalem His-tag nach Ni-NTA-Chromatografie

2: Fraktionspool (F 4 + 5 und 14 – 19) nach Q-Sepharose-Chromatografie

3: Fraktionspool F 44 – 67 nach Größenausschluss-Chromatografie

4: Fraktionspool F 68 – 76 nach Größenausschluss-Chromatografie

Nach Ni-NTA-Chromatografie der rek. MtbA mit His-tag erhält man eine relativ saubere Proteinpräparation (Spur 1). Allerdings ist zu erkennen, dass die Anreicherung der rek. MtbA ohne C-terminalen His-tag über Q-Sepharose gefolgt von Größenausschluss-Chromatografie noch weniger Fremdprotein enthält (Spur 3 + 4).

### 3.4.3 Aktivitätsvergleich der rek. MtbA mit und ohne C-terminalem His-tag

Zum Vergleich der Bismut-Methylierungsaktivitäten beider Präparationen wurden Bismut-Methylierungs-Assays (Methode 2 ,online') durchgeführt und die max.  $(\text{CH}_3)_3$ -Produktionsraten mittels ,online'-ICP-MS-Messungen bestimmt. Der Protein-Vorinkubations-Mix enthielt jeweils  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  rek. Enzym,  $500 \mu\text{M}$  CoM und  $5 \mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Reaktions-Start-Mix ( $2000 \mu\text{M}$  MeCob) gestartet. Die Ergebnisse sind in Tab. 19 zusammengefasst:

**Tab. 19**  $V_{\max\text{Test}}$  der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] in *in vitro*-Bismut-Methylierungs-Assays mit Rohextrakt von rek. *E. coli*, der gereinigten rek. MtbA mit C-terminalem His-tag und der rek. MtbA ohne C-terminalem His-tag (je  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  der zu testenden Proteinprobe,  $2000 \mu\text{M MeCob}$ ,  $500 \mu\text{M CoM}$  und  $1 \mu\text{M Bi-Ammoniumcitrat}$  in  $50 \text{ mM Hepes pH } 7,0$ , (Gesamtvolumen  $1 \text{ ml}$ )).

Probe	$V_{\max\text{Test}} \pm \sigma [\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}]$ (jeweils $n = 3$ )
Rohextrakt rek. <i>E. coli</i>	$0,03 \pm 0,001$
rek. MtbA <u>mit</u> C-terminalem His-tag nach Ni-NTA-Chromatografie	$0,29 \pm 0,002$
rek. MtbA <u>ohne</u> C-terminalem His-tag nach Q-Sepharose- und Größenausschluss-Chromatografie	$0,31 \pm 0,04$

Die spez. Bismut-Methylierungsaktivität nimmt im Laufe der Anreicherung deutlich zu: Die spezifische Aktivität, abgeleitet aus  $V_{\max\text{Test}}$  der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion eines *in vitro*-Assays mit Rohextrakt von rek. *E. coli*-Zellen, beträgt mit  $0,03 \text{ nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$  nur ein Zehntel der Rate der *in vitro*-Assays mit der rek. MtbA. Die Anreicherungen der rek. MtbA mit und ohne His-tag unterscheiden sich kaum in ihrer spez. Aktivität.

Da jedoch mögliche Wechselwirkungen des Bismuts mit dem His-tag nicht auszuschließen waren, die die spezifischen Eigenschaften der MtbA verfälschen könnten, wurde in dieser Arbeit die gereinigte rek. MtbA ohne His-tag detaillierter untersucht.

### 3.5 Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Lagerungsbedingungen der MtbA auf die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion

Um abzusichern, dass die beobachtete CoM-abhängige Bismut-Methylierung tatsächlich eine Enzym-abhängige Reaktion darstellt, wurden zwei Präparationen der His-Tag-freien rekombinanten MtbA mit unterschiedlicher spezifischer Aktivität in die Bismut-Methylierungs-Assays eingesetzt und bezüglich ihrer katalysierenden Wirkung auf die Bismut-Methylierung verglichen.

Die zwei verschiedenen Proteinpräparationen der rek. MtbA wurden, wie unter 2.2.3.2 beschrieben, gereinigt. Beide Präparationen zeigten den gleichen gelelektrophoretisch ermittelten Reinheitsgrad.

Präparation I:

Diese Präparation wies eine Proteinkonzentration von  $0,44 \text{ mg ml}^{-1}$  auf und wurde in 50 mM Hepes-Puffer pH 7,0, der 20 % Glycerin enthielt unter aerober Atmosphäre, in kleinen Portionen, die je nach Bedarf aufgetaut wurden bei  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Präparation II

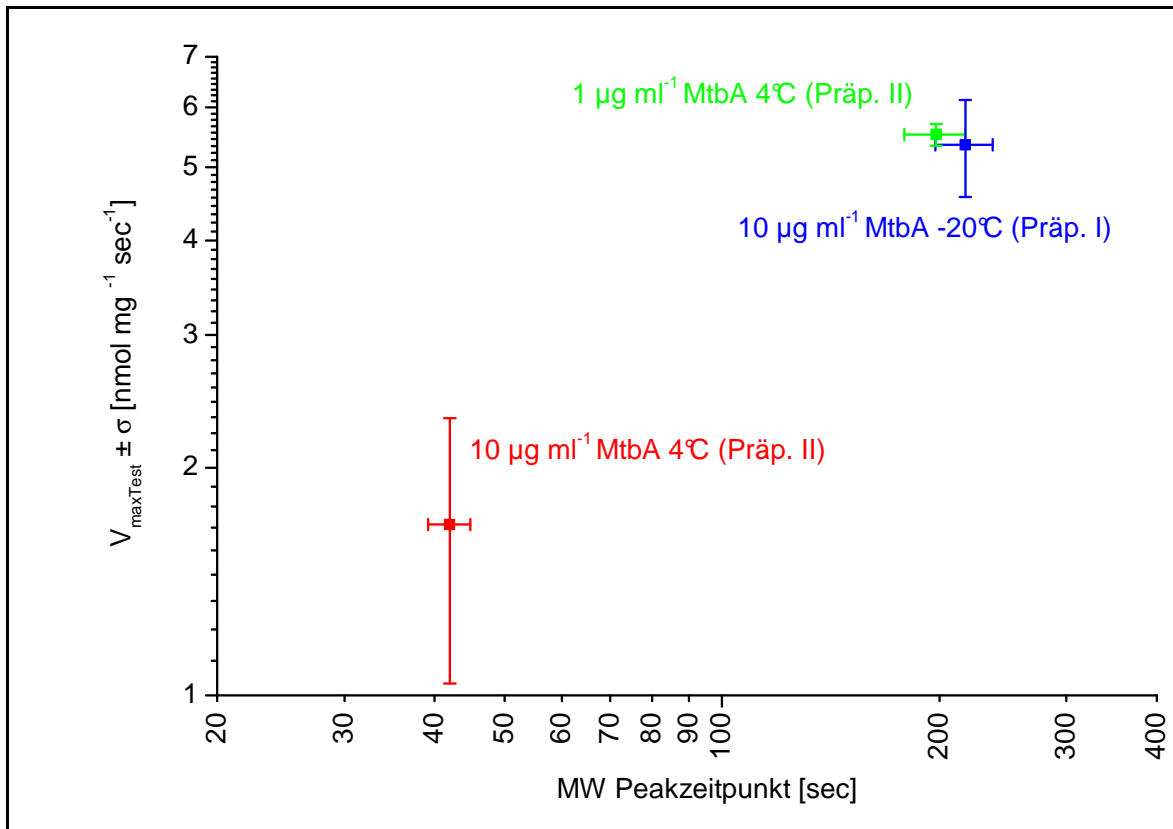
Diese Präparation wies eine Proteinkonzentration von  $4,2 \text{ mg ml}^{-1}$  auf und wurde in 50 mM Hepes-Puffer pH 7,0 unter aerober Atmosphäre bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Aliquots der MtbA-Proteinlösung wurden unter verschiedenen Bedingungen gelagert und auf ihre Bismut-Methylierungsaktivität in *in vitro*-Assays getestet (siehe Tab. 20). Die *in vitro*-Assays wurden durch Zugabe des jeweiligen Aliquots der MtbA in 50 mM Hepes pH 7,0 (= Protein-Vorinkubations-Mix) gestartet. In den Reaktionsgefäßen waren jeweils  $5 \text{ }\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat,  $500 \text{ }\mu\text{M}$  CoM und  $2000 \text{ }\mu\text{M}$  MeCob (= Reaktionsstart-Mix) vorgelegt. Die Ergebnisse sind in Abb. 30 zusammengefasst.

**Tab. 20      Konzentrationen und Lagerungsbedingungen der rek. MtbA (frische MtbA = direkt nach Aufreinigung, s. 2.2.3.2)**

<b>Präparation</b>	<b>Lagerungsbedingungen des Enzyms</b>
<b><math>10 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}</math> MtbA <math>4 \text{ }^{\circ}\text{C}</math> (Präp. II)</b>	frische MtbA, 2 Tage bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$
<b><math>1 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}</math> MtbA <math>4 \text{ }^{\circ}\text{C}</math> (Präp. II)</b>	frische MtbA, 2 Tage bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$
<b><math>10 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}</math> MtbA mit 25 % Glycerin - <math>20 \text{ }^{\circ}\text{C}</math> (Präp. I)</b>	frische MtbA langsam auf $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und 2 Tage gelagert





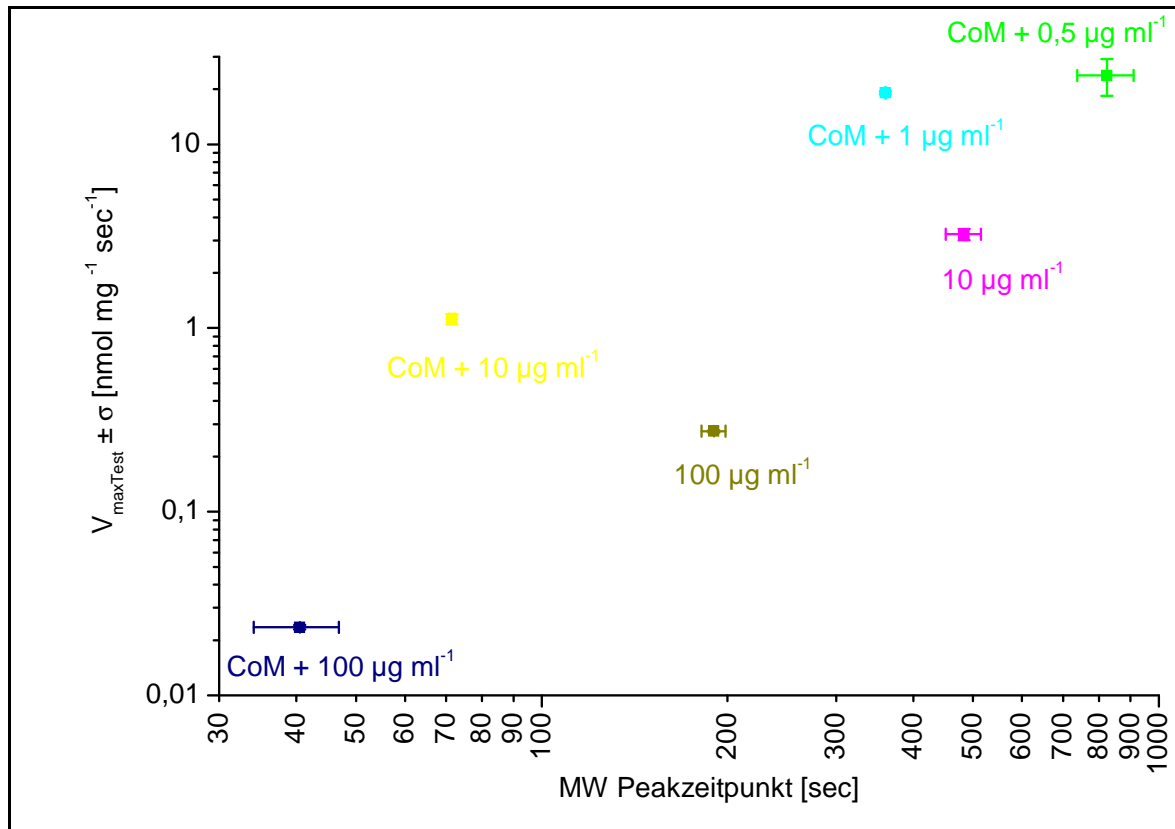
**Abb. 30** Auswirkungen der Lagerungsbedingungen und der eingesetzten Konzentration der MtbA auf  $V_{\max\text{Test}}$  [nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>] und Lag-Phase der (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion; (Mittelwerte mit Standardabweichungen, n = 3). Die Bismut-Methylierungs-Assays enthielten jeweils 500 µM CoM, 2000 µM MeCoB und 5 µM Bi-Ammoniumcitrat und die Reaktion wurde durch Zugabe des Protein-Vorinkubations-Mix (MtbA in 50 mM Hepes pH 7,0) gestartet.

Wie in Abb. 30 deutlich zu erkennen ist, haben die Lagerungsbedingungen einen gravierenden Einfluss auf die Bismut-Methylierungsaktivität des Enzyms. Langsames Einfrieren bei -20 °C bewirkt, dass  $V_{\max\text{Test}}$  höher ist, aber später erreicht wird, wohingegen bei Zugabe von frischem Enzym früh ein niedrigeres  $V_{\max\text{Test}}$  erreicht wird. Wird von Präp. II nur ein Zehntel der Enzymkonzentration in den Assay eingesetzt, verlängert sich die Lag-Phase und  $V_{\max\text{Test}}$  entspricht dem von Präp. I in zehnfach höherer Konzentration. Langsames Einfrieren verursacht scheinbar Schäden am Enzym, die zu einer verzögerten Produktion von (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi führen. Dieser Befund untermauert die Annahme, dass die hier untersuchte Produktion von (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi ein enzymabhängiger Prozess ist. Unklar ist allerdings noch, warum das nach längerer Lag-Phase erreichte  $V_{\max\text{Test}}$  in Ansätzen mit Präp. I höher ist als das nach kürzerer Lag-Phase erreichte der Präp. II.

### 3.5.1 $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion in Abhängigkeit von der MtbA-Konzentration und der spezifischen Aktivität der Enzym-Präparation

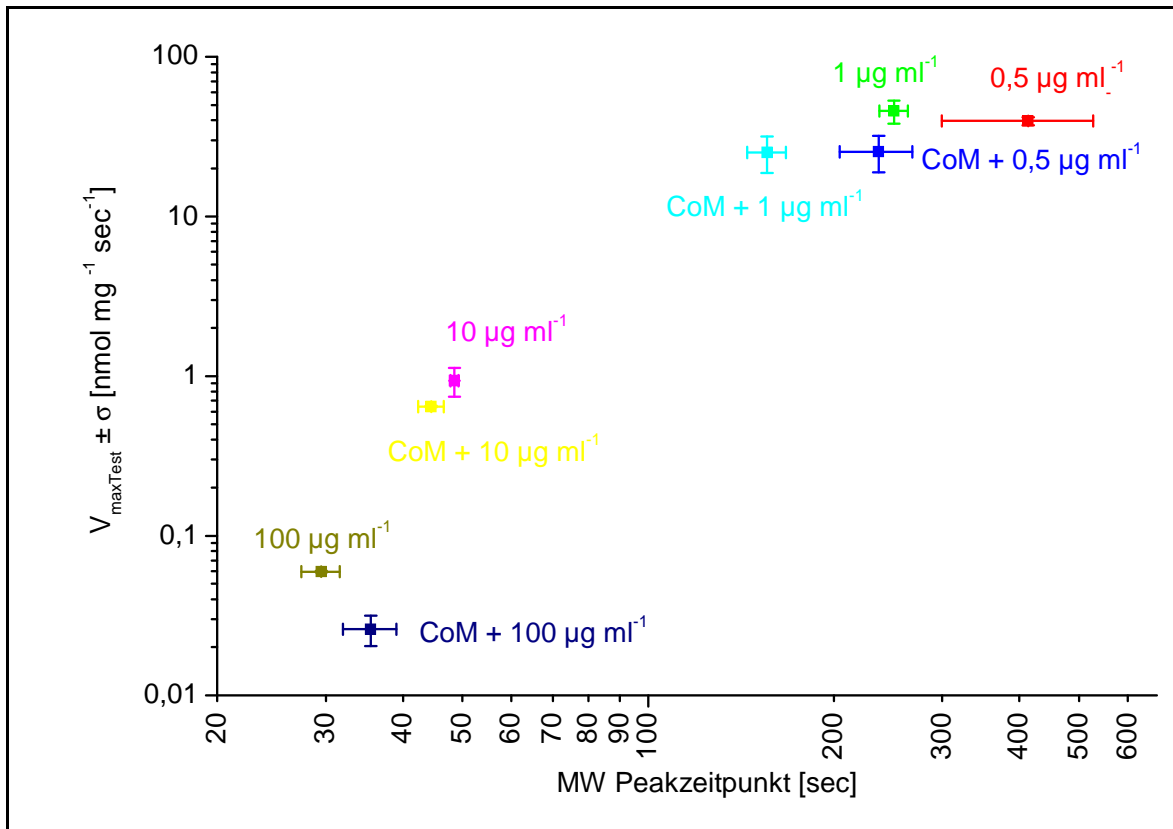
In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Lagerungsbedingungen und die eingesetzte Enzymkonzentration einen starken Einfluss auf die Aktivität der rek. MtbA haben. Mit den im Folgenden beschriebenen Versuchen sollte für beide Präparationen bestätigt werden, dass niedrige Konzentrationen des Enzyms zu einem hohen  $V_{\text{maxTest}}$  und einer langen Lag-Phase führen und hohe Konzentrationen entsprechend das Gegenteil bewirken. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Vorinkubation des Enzyms mit seinem natürlichen Substrat CoM diese Effekte möglicherweise beeinflussen kann. In die Bismut-Methylierungs-Assays wurden unterschiedliche Konzentrationen der jeweiligen Präparation der rek. MtbA ( $0,5 - 100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) eingesetzt. Der Protein-Vorinkubations-Mix enthielt entweder nur die MtbA in Hepes oder zusätzlich je  $500 \mu\text{M}$  CoM. Die Assays wurden durch Zugabe des Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix (entweder  $500 \mu\text{M}$  CoM,  $5 \mu\text{M}$  Bismut-Ammoniumcitrat und  $2000 \mu\text{M}$  MeCob oder nur  $5 \mu\text{M}$  Bismut-Ammoniumcitrat und  $2000 \mu\text{M}$  MeCob) gestartet.

In Abb. 31 sind die Ergebnisse der Versuche mit Präparation I grafisch dargestellt. Es fällt auf, dass eine deutliche  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion erst ab einer Enzymkonzentration von  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  detektiert werden konnte. In Gegenwart von CoM im Protein-Vorinkubations-Mix findet auch schon bei einer Enzymkonzentration von  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$   $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion statt, die Lag-Phase ist in diesem Fall sehr lang und  $V_{\text{maxTest}}$  am höchsten im Vergleich zu den anderen Konzentrationen.



**Abb. 31 Präparation I der rek. MtbA:** Einfluss der Enzymkonzentration in Gegenwart / Abwesenheit von CoM im Protein-Vorinkubations-Mix auf  $V_{\text{maxTest}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und die Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 4$ ). Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des jeweiligen Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix gestartet.

In Abb. 32 sind die Ergebnisse der Versuche mit Präparation II grafisch dargestellt. In diesem Fall ist schon bei einer Enzymkonzentration von  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  ohne CoM im Protein-Vorinkubations-Mix bereits eine deutliche  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion detektierbar. Das unterstützt die Annahme, dass diese Präparation weniger Schäden aufweist als Präparation I.



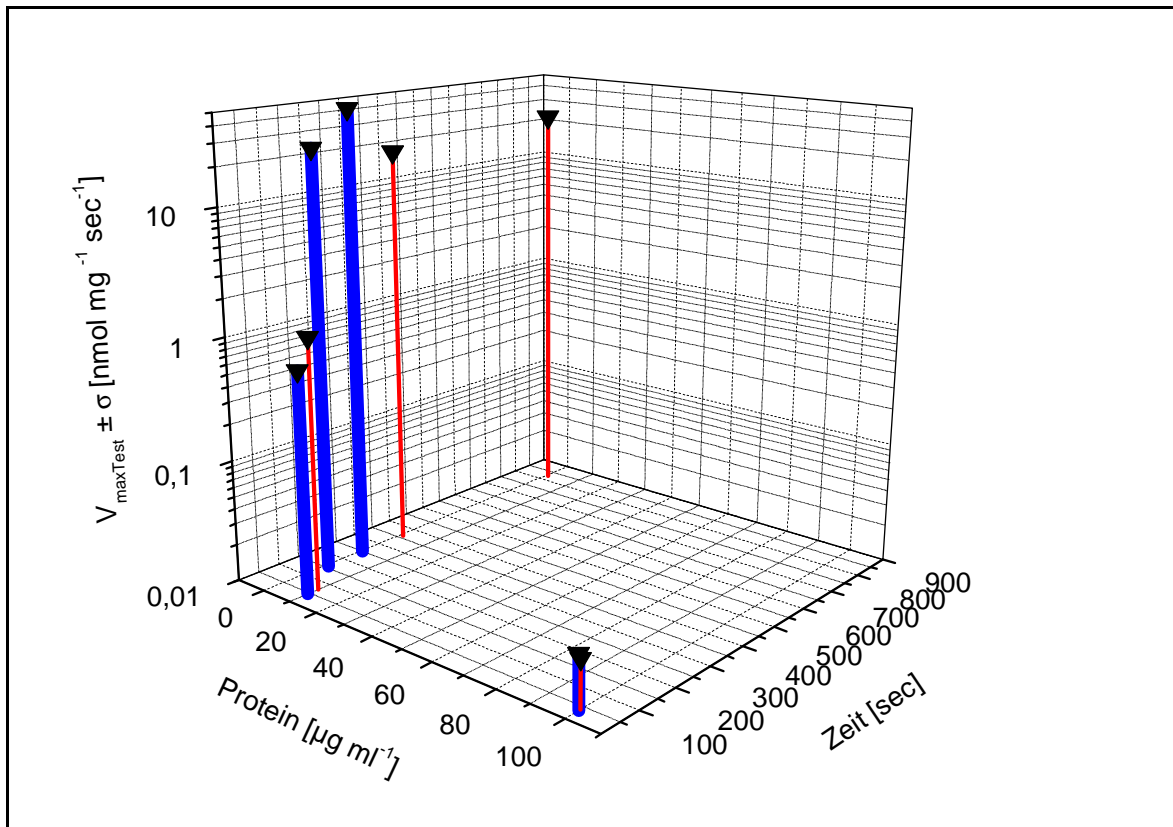
**Abb. 32 Präparation II der rek. MtbA:** Einfluss der Enzymkonzentration in Gegenwart / Abwesenheit von CoM im Protein-Vorinkubations-Mix auf  $V_{\text{maxTest}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und die Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. MtbA (Präparation II) von *M. mazei*; (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 4$ ). Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des jeweiligen Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix gestartet.

In Abb. 31 und Abb. 32 ist ebenfalls deutlich zu erkennen, dass  $V_{\text{maxTest}}$  umso höher und die Lag-Phase umso länger ist, je niedriger die eingesetzte Enzymkonzentration ist. Die Vorinkubation des Enzyms mit CoM mildert diese Effekte. Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass reversible Schäden am Enzym für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, die durch Steigerung der eingesetzten Enzymkonzentration oder Vorinkubation mit CoM gemildert / behoben werden können. Welche Art von Schädigung am Enzym vorliegt, ist unklar. Eventuell sind oxidative Schädigungen denkbar.

Die Verkürzung der Lag-Phase bzw. zunehmende Geschwindigkeit spricht für eine konzentrationsabhängige Enzymaktivität. Wider Erwarten wird aber  $V_{\text{maxTest}}$  der Bismut-Methylierung mit Erhöhung der Proteinkonzentration nicht gesteigert. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass die CoM-Methylierung durch die MtbA in den Bismut-Methylierungs-Assays wahrscheinlich als Konkurrenzreaktion zur Bismut-Methylierung abläuft: Eventuell läuft die Umsetzung von CoM beschleunigt ab, wodurch weniger

Methylgruppen für die Bismut-Methylierung zur Verfügung stehen. In den Tab. 30 und Tab. 31 im Anhang sind die Einzelwerte zusammengefasst.

In Abb. 33 sind  $V_{\max\text{Test}}$  und Lag-Phasen der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die Präparationen I und II der rek. MtbA in Gegenwart von CoM im Protein-Vorinkubations-Mix vergleichend dargestellt. Die Standardabweichungen sind zu Gunsten der Übersichtlichkeit der Darstellung nicht einbezogen.



**Abb. 33** Einfluss der Enzymkonzentration der Präparationen I (rot) und II (blau) der rek. MtbA in Gegenwart von CoM im Protein-Vorinkubations-Mix auf  $V_{\max\text{Test}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und die Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion. Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des jeweiligen Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix gestartet.

In Abb. 33 ist im Vergleich noch einmal deutlich zu erkennen, dass die Lag-Phase n der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung in Ansätzen mit Enzym-Präparation II wesentlich kürzer sind als in Ansätzen mit Präparation I.  $V_{\max\text{Test}}$  beider Präparationen sind hingegen sehr ähnlich, was dafür spricht, dass das Enzym in beiden Präparationen gleich aktiv ist, wenn es aktiv ist. Es dauert allerdings, je nach eingesetzter Konzentration, unterschiedlich lange, bis diese aktive Enzymform vorliegt.

In allen folgenden Versuchen wurde eine Proteinfraction der His-tag-freien MtbA Präp. I verwendet, die in 20 % Glycerin bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert wurde (Endkonzentration:  $10\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

### **3.6 Identifizierung der Intermediate und Produkte der enzymatischen CoM-Methylierung ohne und mit Bi-Ammoniumcitrat (über: UV/VIS-spektrofotometrische Bestimmungen)**

Die metabolisch relevante Reaktion, die von der MtbA katalysiert wird, besteht in der Übertragung von Methylgruppen vom Methylcobalamin auf Coenzym M.

Diese Übertragung erfolgt (nach gängigen Vorstellungen) durch einen nukleophilen Angriff der partiell deprotonierten Thiolgruppe des enzymgebundenen CoM auf das partiell positiv geladene C-Atom der Methylgruppe des MeCob. Infolge dieser Reaktion wird als weiteres Produkt (neben Methyl-CoM) Cob(I)alamin gebildet, das ein stark negatives Redoxpotenzial ( $E^0 = -600 \text{ mV}$  (Lexa *et al.* 1977; Dryhurst *et al.* 1982; Lexa *et al.* 1983)) besitzt und leicht oxidiert werden kann (zu Cob(II)alamin bzw. Cob(III)alamin). Da die verschiedenen Zustandsformen von Cobalamin (siehe Tab. 21 und Abb. 34) charakteristische Absorptionseigenschaften im UV/VIS-Bereich (200 – 600 nm) aufweisen, kann der Verlauf der Demethylierung von Methylcobalamin spektralfotometrisch verfolgt und die entstehenden Intermediate und Produkte identifiziert werden. Damit bietet es sich an, die Transmethylierung auch in Gegenwart von Bi-Ammoniumcitrat zu verfolgen, um die Beeinflussung der Reaktion durch das Metallion zu erfassen.

Die Versuche wurden im Anaeroben-Zelt angesetzt und in gasdichten, lichtgeschützten Quarzglasküvetten durchgeführt. Die Reaktionen wurden über spektrofotometrische Methoden (Demethylierung von MeCob und Bildung von Cob(I)) verfolgt (siehe 2.2.4.6). Die Versuchsreihe wurde von Herrn Thomas Knura durchgeführt, der mir die Ergebnisse freundlicherweise für meine Arbeit zur Verfügung stellte.

Die Reaktionsansätze (Gesamtvolumen 1 ml) enthielten 260  $\mu\text{M}$  MeCob, 1500  $\mu\text{M}$  CoM, 10  $\text{mg ml}^{-1}$  MtbA-Protein und 0 bzw. 75  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat in 50 mM Hepes-Puffer pH 7,0. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeCob gestartet. Es war leider nicht möglich die Assays bei den gleichen Konzentrationen durchzuführen, wie sie bei den massenspektrometrischen Bismut-Methylierungsanalysen eingesetzt wurden, da eine Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  MeCob eine zu hohe Extinktion zeigt, um spektrofotometrische Bestimmungen durchzuführen.

Tab. 21 Absorptionsmaxima der Cobalamin-Derivate

Cobalamin-Derivat	Absorptionsmaxima [nm]
Cob(I)alamin	285 und 388
Cob(II)alamin	310 und 475
Aquocob(III)alamin	350 und 520
Methylcob(III)alamin	260 und 520

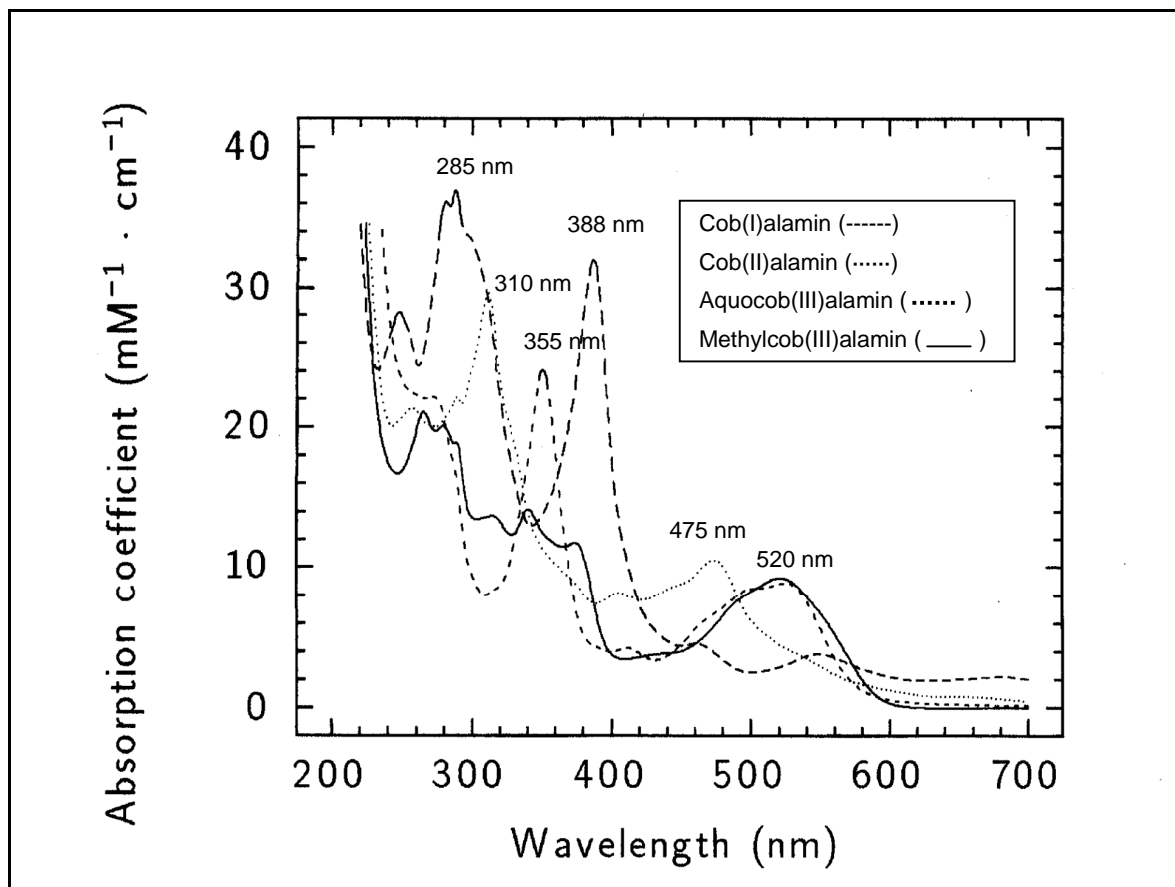
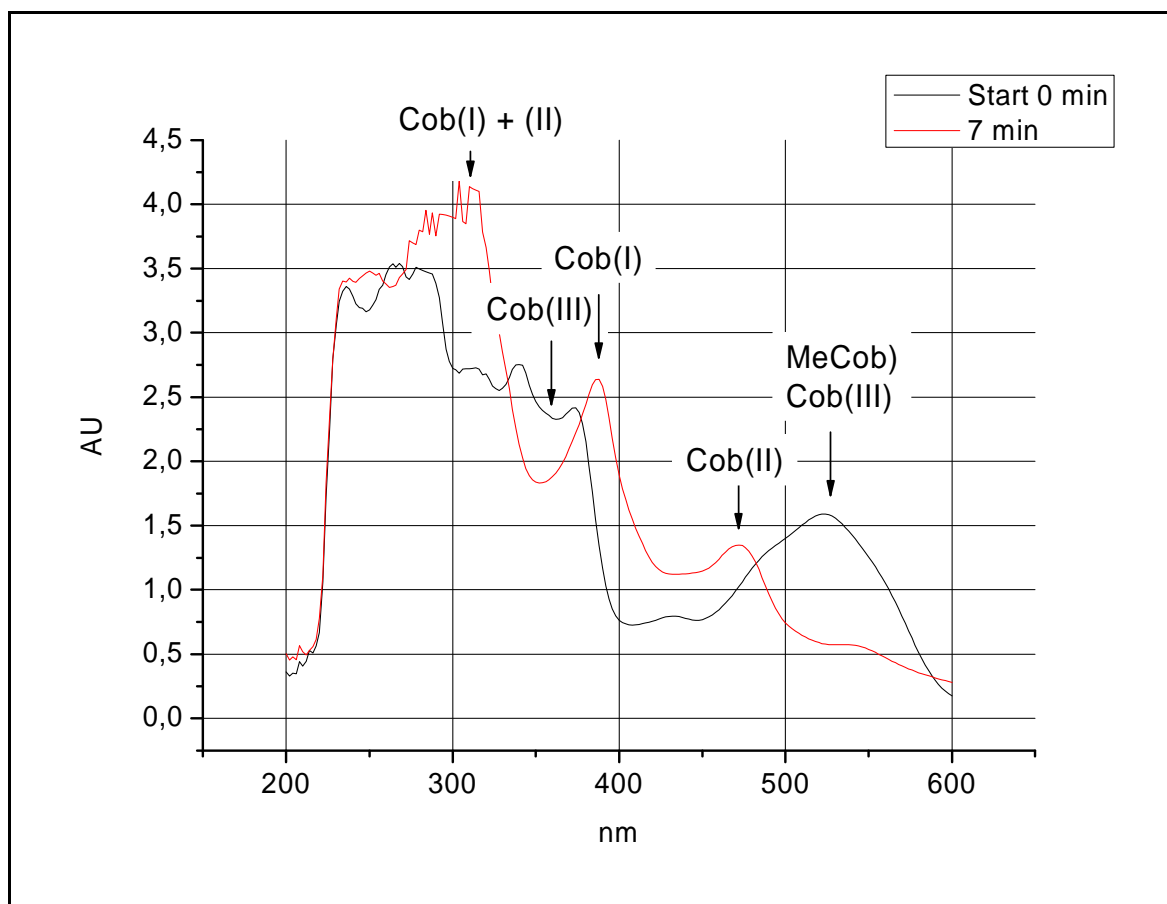


Abb. 34 Cobalamin-Spektren in 50 mM Kaliumphosphat pH 7,2 (modifiziert nach (Kreft et al. 1994)).

In Abb. 35 ist die Veränderung des UV/VIS-Spektrums eines Reaktionsansatzes ohne Bismut nach 7 min Reaktionszeit im Vergleich zur Startsituation dargestellt.



**Abb. 35** Veränderung des MeCob-UV/VIS-Spektrums (200 – 600 nm) im Laufe der enzymatisch katalysierten Transmethylierung von MeCob zu CoM über den Zeitraum von 7 min. Die Ansätze enthielten 260  $\mu\text{M}$  MeCob, 1500  $\mu\text{M}$  CoM und 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MtbA in 50 mM Hepes pH 7,0 und wurden unter Rotlicht im Anaerobenzelt in gasdichten, sauerstofffreien Quarzglasküvetten angesetzt. Der Ansatz wurde durch Zugabe von MeCob gestartet.

Die Veränderung des Spektrums nach 7 min Reaktionszeit (Abb. 35) zeigt deutlich, dass MeCob in Gegenwart von CoM und rek. MtbA demethyliert wird. Das Absorptionsmaximum bei 520 nm verschwindet. Gleichzeitig kann man eine signifikante Zunahme der Extinktion bei 388 nm erkennen, die die Bildung von Cob(I)alamin anzeigt.

Der Nachweis der Bildung von Cob(I) im Verlauf der Reaktion hat hohe Bedeutung für das mechanistische Verständnis der Methylierung von Bismut durch die rekombinante MtbA, da dieses Intermediat auch im abiotischen Reaktionsansatz den Methyltransfer von MeCob auf Bismut erlaubt (siehe 3.2.3). Es ist naheliegend zu vermuten, dass die intermediäre Konzentration und Bildungsgeschwindigkeit des Cob(I) wesentlichen Einfluss auf den Zeitverlauf und die Geschwindigkeit der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion in Gegenwart von Bi-Ammoniumcitrat hat. Insofern ist zu erwarten, dass eine Erniedrigung der Enzymkonzentration durch Verdünnen oder partielle Denaturierung durch ungünstige Lagerungsbedingungen eine niedrigere Demethylierungsrate von MeCob und einen



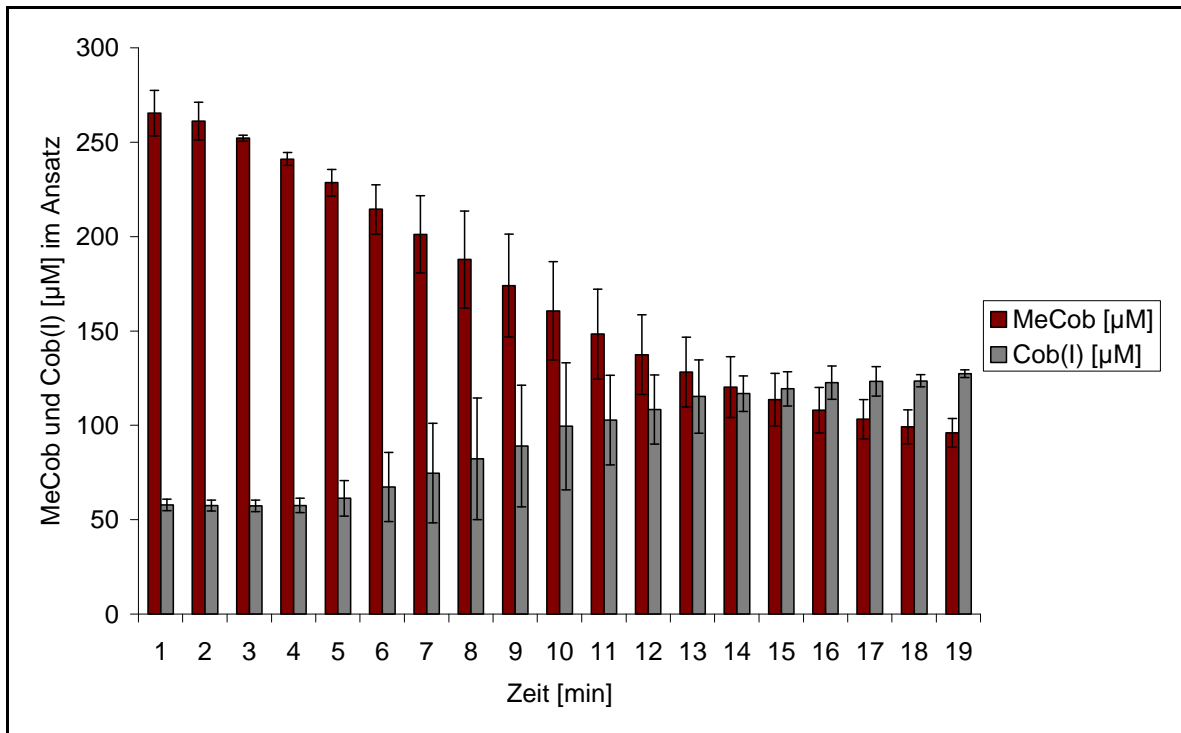
langsameren Anstieg von Cob(I)alamin zur Folge hat. Beide Effekte könnten die typischen Merkmale der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion mit Präp. I und bei niedrigen Enzymkonzentrationen ( $\ll 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) erklären, die in Abschnitt 3.5 beschrieben sind: Eine verlängerte Lag-Phase (bedingt durch die langsamer ansteigende Cob(I)-Konzentration) und eine erhöhte  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktionsrate (bedingt durch einen langsameren Methyltransfer von MeCob auf CoM, wodurch sich ein höheres Methylgruppen-Übertragungspotenzial für die Methylierung von Bismut ergibt).

Um dies zu prüfen, wurde in einem weiteren Versuch die Veränderung der Cob(I)- und MeCob-Konzentrationen im Verlauf der Reaktion bei deren jeweils charakteristischen Absorptionsmaxima (siehe Tab. 21) mit den Proteinpräparationen I und II (je  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) verfolgt. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (siehe 2.2.4.4.1; Extinktionskoeffizienten siehe 2.2.4.6).

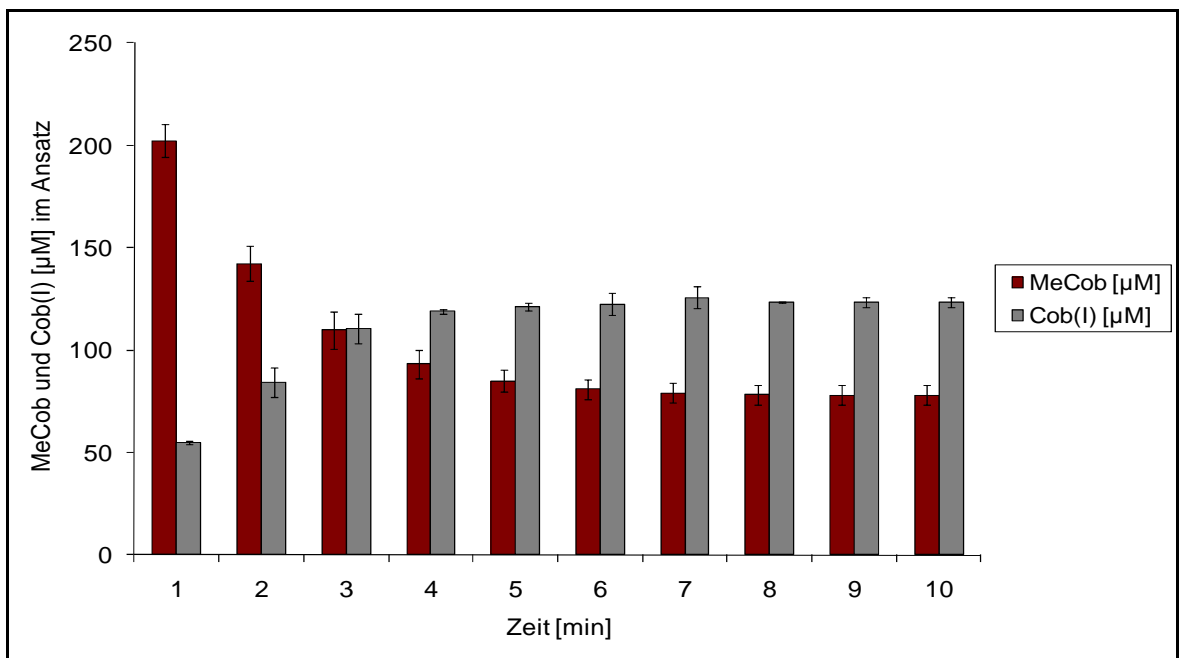
Beim Vergleich der Abb. 37 und Abb. 36 wird deutlich, dass MeCob bei Präp. II tatsächlich schneller demethyliert und Cob(I) schneller gebildet wird als im Assay mit Präp. I (Einzelwerte siehe Tab. 36 im Anhang).

Innerhalb von 7 min nimmt die MeCob-Konzentration um  $124 \mu\text{M}$  ab und bleibt danach konstant. Simultan nimmt die Menge an Cob(I) zu (von  $54,9$  auf  $123,3 \mu\text{M}$ ).

Im Ansatz mit Präp. I beginnt die Demethylierung des Mecob und die Bildung des Cob(I) erst nach 3 min und die Reaktion verläuft insgesamt langsamer und länger, erst nach 17 min beginnt allmählich eine konstante Phase. Dieser verzögerte Start korreliert mit der zuvor beschriebenen Lag-Phase der Bismut-Methylierung.



**Abb. 36** Spektrofotometrisch verfolgte Demethylierung von MeCob (Absorptionsmaximum 520 nm) und Bildung von Cob(I) (Absorptionsmaximum 388 nm) in anaeroben *in vitro*-Assays mit 1500  $\mu\text{M}$  CoM und 10  $\text{mg ml}^{-1}$  MtbA Präp. I. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeCob (Endkonzentration 260  $\mu\text{M}$ ) gestartet.

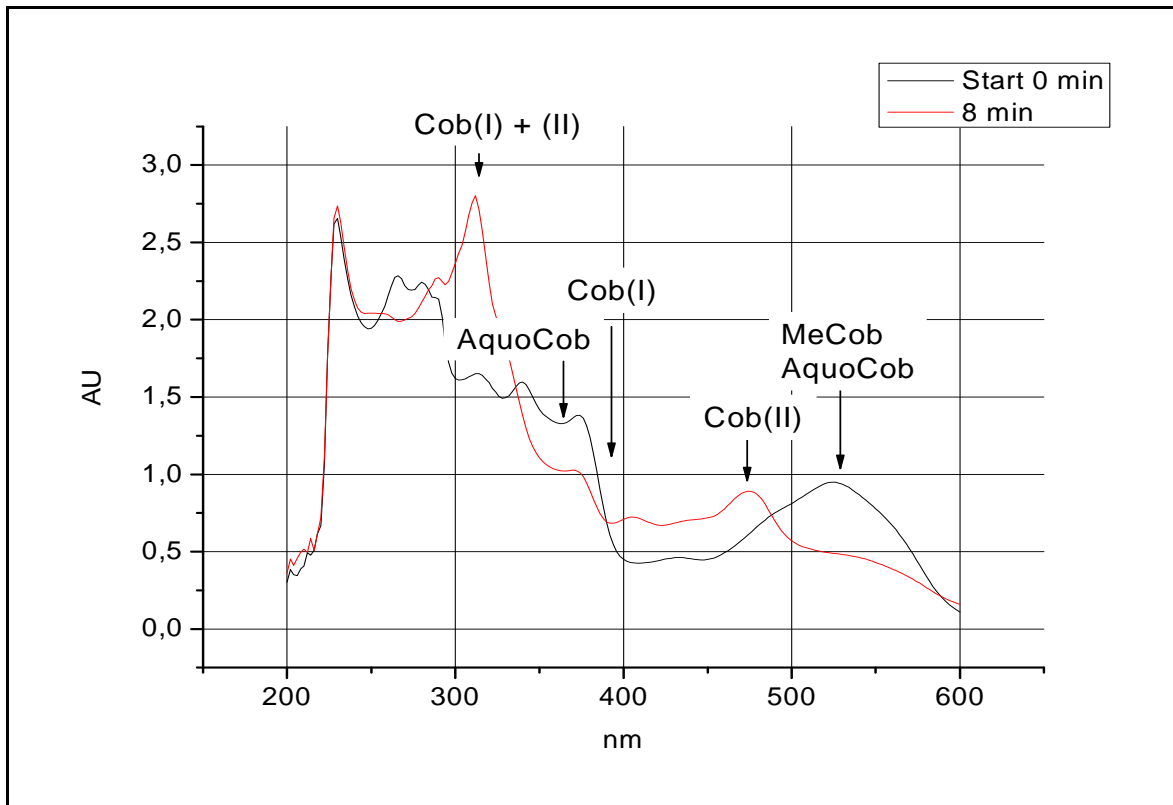


**Abb. 37** Spektrofotometrisch verfolgte Demethylierung von MeCob (Absorptionsmaximum 520 nm) und Bildung von Cob(I) (Absorptionsmaximum 388 nm) in anaeroben *in vitro*-Assays mit 1500  $\mu\text{M}$  CoM und 10  $\text{mg ml}^{-1}$  MtbA Präp. II. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeCob (Endkonzentration 260  $\mu\text{M}$ ) gestartet.

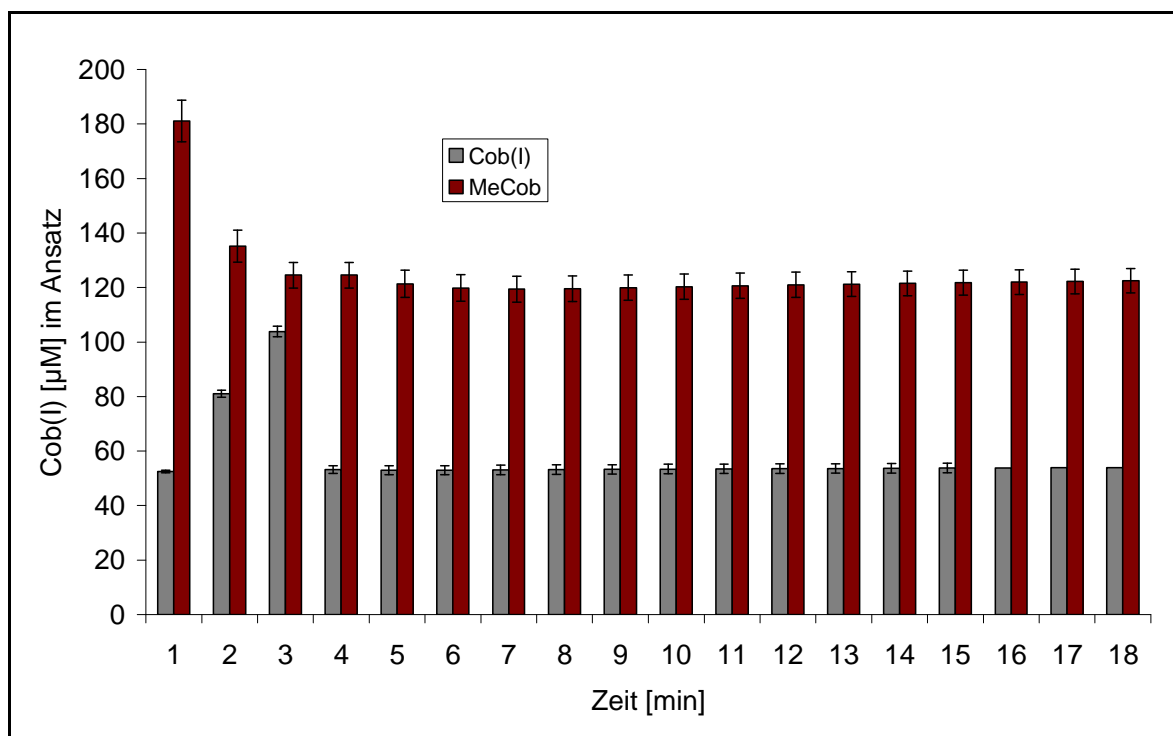
Um die Auswirkungen von Bismut auf die Demethylierungsreaktion zu untersuchen, wurde das UV/VIS-Spektrum (200 – 600 nm) entsprechender Reaktionsansätze (mit 260  $\mu\text{M}$  MeCob, 1500  $\mu\text{M}$  CoM und 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MtbA Präp. II) in Gegenwart von Bismut aufgenommen. Wie in Abb. 38 zu erkennen ist, wird in Gegenwart von Bismut (75  $\mu\text{M}$ ) MeCob weiterhin demethyliert (Abnahme des Absorptionsmaximums bei 520 nm), allerdings wird kein Cob(I) mehr gebildet.

Anschließend wurden Ansätze analysiert, in denen die Reaktion mit 260  $\mu\text{M}$  MeCob, 1500  $\mu\text{M}$  CoM und 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  rek. MtbA Präp. II zunächst 2 min ohne Bismut ablief, währenddessen Cob(I)-Bildung beobachtbar war. Anschließend wurde den Ansätzen anaerob Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration 75  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. In Abb. 39 ist deutlich zu erkennen, dass sofort nach Bismut-Zugabe die Cob(I)-Konzentration deutlich abnimmt und danach kein neues Cob(I) mehr entsteht. Außerdem wird nach Bismut-Zugabe kein weiteres MeCob demethyliert, was ein Indiz für eine Hemmung der enzymatisch katalysierten Methylgruppenübertragung von MeCoB auf CoM ist.

Um sicherzustellen, dass die oben beschriebenen Effekte durch Bismut verursacht wurden und nicht eventuell durch Sauerstoff, der bei der Zugabe von Bismut unbeabsichtigt in die Probe gelangte, wodurch Cob(I) zu Cob(III) oxidiert würde, wurde der gleiche Versuch durchgeführt und anstelle des Bismut nach 5 min Hepes pH 7,0 zugegeben, was keinen Einfluss auf die Cob(I)-Konzentration hatte.



**Abb. 38** Veränderung des MeCob-UV/VIS-Spektrums (200 – 600 nm) in Gegenwart von Bi-Ammoniumcitrat im Laufe der enzymatisch katalysierten Transmethylierung von MeCob zu CoM. Die Ansätze enthielten 260  $\mu\text{M}$  MeCob, 1500  $\mu\text{M}$  CoM, 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MtbA und 75  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat in 50 mM Hepes pH7,0 und wurden in gasdichten, sauerstofffreien Quarzglasküvetten unter Rotlicht im Anaerobenzelt angesetzt. Der Ansatz wurde durch Zugabe von MeCob gestartet.



**Abb. 39** Spektrofotometrisch verfolgte Demethylierung von MeCob (Absorptionsmaximum 520 nm) und Bildung von Cob(I) (Absorptionsmaximum 388 nm) in anaeroben *in vitro*-Assays mit 1500 µM CoM und 10 mg ml<sup>-1</sup> MtbA Präp. II. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeCob (Endkonzentration 260 µM) gestartet. Nach 2 min wurde Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration 75 µM) anaerob zugegeben.

### 3.6.1 Nachweis teilmethylierter Bismutderivate im biotischen und abiotischen *in vitro*-Assay durch Ethylierung mit Natriumtetraethylborat

Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden von meinem Kollegen Dominik Pieper (AG Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt und die Ergebnisse wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Um die Mechanistik der Methylgruppenübertragung auf Bismut besser zu verstehen, wurde überprüft, ob teilmethylierte, nicht-flüchtige Bismutspezies in der Flüssigphase der *in vitro*-Assays vorliegen. Dazu wurden sowohl abiotische Ansätze wie unter 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben als auch biotische Ansätze (siehe 3.5) angesetzt und gestartet. Die Proben wurden wie unter 2.2.4.5 beschrieben ethyliert und mittels PT-GC/ICP-MS-Analytik nachgewiesen. In Abb. 40 ist ein typisches Chromatogramm einer Ethylierung dargestellt. In Tab. 22 sind die Retentionszeiten der Bismutderivate zusammengefasst.

Tab. 22 Retentionszeiten der detektierten Bismutderivate

Derivat	Retentionszeit [sec]
$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	80 – 90
$(\text{CH}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_5)\text{Bi}$	95 – 100
$(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Bi}$	106 – 118
$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Bi}$	132 – 150

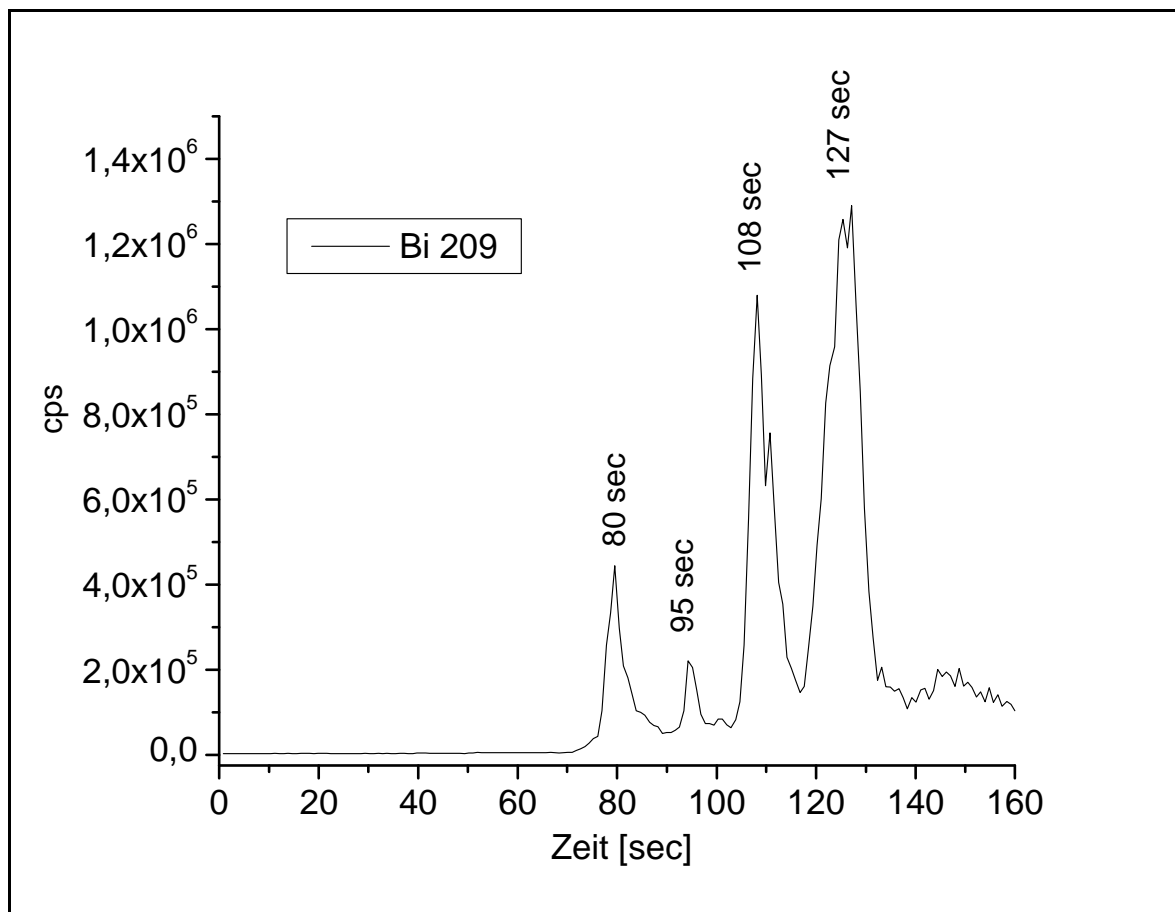


Abb. 40 Typisches Chromatogramm einer PT-GC/ICP-MS-Analyse (Methode ‚Purge and Trap‘) der Gasphase nach Ethylierung eines abiotischen *in vitro*-Assays mit 5  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat und 2000  $\mu\text{M}$  MeCob in 50 mM Hepes pH 7,0. Die Reaktion wurde im Dunkeln durch Zugabe von TiCit (Endkonzentration 100  $\mu\text{M}$ ) gestartet und nach 15-minütiger Inkubation im Schüttler bei 30 °C wurde ein Aliquot der Flüssigphase mit Natriumtetraethylborat ethyliert.

In Tab. 23 sind die jeweiligen Maxima der Peaks der Analyten in counts per second angegeben in den einzelnen *in vitro*-Assays zum Vergleich zusammengefasst. Wie an den großen Standardabweichungen zu erkennen ist, eignet sich die Methode der Ethylierung mit Natriumtetraethylborat nur für eine qualitative, nicht aber quantitative

Aussage. Deswegen wurde auf eine detaillierte quantitative Auswertung der Ergebnisse verzichtet. Es kann allerdings eindeutig festgehalten werden, dass in allen *in vitro*-Assays (sowohl biotisch als auch abiotisch) teilmethylierte Bismutspezies zu finden sind, was nahelegt, dass die Methylgruppen schrittweise vom Methylcobalamin übertragen werden, ungeachtet des Reaktionsmechanismus (Licht-, TiCit-, Cob(I)- oder Enzym-induziert). Die teils sehr großen Mengen an Triethylbismut sind auf Memory-Effekte des Säulenmaterials zurückzuführen, da  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Bi}$  die häufigste Verbindung in den Proben war und so im Laufe der Analysen auf der Säule akkumulierte.

**Tab. 23 Mittelwerte ( $\pm \sigma$ ) der Peakmaxima [cps] der detektierten flüchtigen Bismutderivate nach Ethylierung mit Natriumtetraethylborat**

Derivat	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	$(\text{CH}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_5)\text{Bi}$	$(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Bi}$	$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Bi}$
<b>abiotisch</b>	141.333	303.333	1,733.333	4,833.333
<b>Licht-induziert</b>	$\pm$ 37.754	$\pm$ 85.049	$\pm$ 971.253	$\pm$ 2,500.667
<b>abiotisch</b>	310.000	206.667	1,266.667	1,500.000
<b>TiCit-induziert</b>	$\pm$ 105.830	$\pm$ 30.551	$\pm$ 288.675	$\pm$ 793.725
<b>abiotisch</b>	110.000	56.500	485.000	22,500.000
<b>Cob(I)-induziert</b>	$\pm$ 28.284	$\pm$ 19.092	$\pm$ 21.213	$\pm$ 14,849.242
<b>biotisch</b>	440.000	533.333	666.667	10,000.000
<b>Enzym-induziert</b>	$\pm$ 143.000	$\pm$ 513.160	$\pm$ 208.167	$\pm$ 3,605.551

### 3.7 Beeinflussende Faktoren der enzymatischen Bismut-Methylierung: Abhängigkeit von der Konzentration der Reaktanten

Um die Funktion der rek. MtbA bei der Bismut-Methylierung näher zu charakterisieren, wurde die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen der Reaktanten auf diese Reaktion untersucht. Alle Messreihen wurden in lichtundurchlässigen Reaktionsgefäßen unter anaerober Atmosphäre nach Methode 2 („online“) durchgeführt, d. h. die max.  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktionsrate pro sec  $V_{\text{maxTest}}$  diente als Maß für die Bismut-Methylierungsaktivität des Enzyms. Außerdem wurde die Dauer der Lag-Phase bis zum Erreichen von  $V_{\text{maxTest}}$  in die Auswertung einbezogen. Alle Reaktionen wurden durch Zugabe des Protein-Vorinkubations-Mix (mit CoM, Bi-Ammoniumcitrat und Enzym

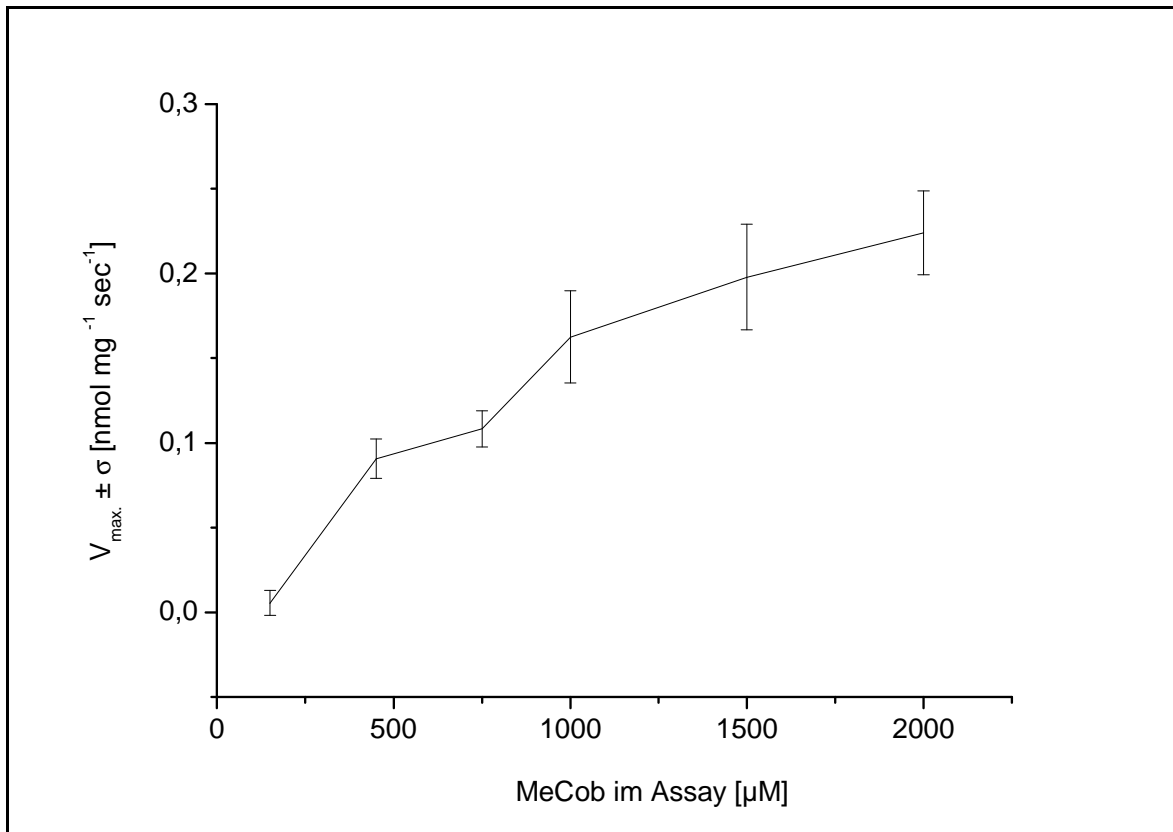
in den entsprechenden Konzentrationen) zum Reaktions-Start-Mix (MeCob) in den Reaktionsvials gestartet (s. 2.4.4.3.2). Bei den folgenden Versuchen wurde (soweit nicht gekennzeichnet) die (vermutlich geschädigte) Präparation I der rek. MtbA verwendet, da besonders aktivitätsfördernde Effekte mit dieser Präparation deutlicher zu erkennen sind.

### 3.7.1 $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion in Abhängigkeit von der MeCob-Konzentration

Für die Bestimmung des Sättigungsverhaltens der MtbA gegenüber MeCob wurden Bismut-Methylierungs-Assays (Gesamtvolumen 1 ml) eingesetzt, in denen die MeCob-Konzentration über den Bereich von 150 – 2000  $\mu\text{M}$  variiert wurde. In die Reaktionsgefäße wurden die jeweiligen MeCob-Mengen (= Reaktionsstart-Mix) vorgelegt und durch Zugabe des Protein-Vorinkubations-Mix (500  $\mu\text{M}$  CoM, 1  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat sowie 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MtbA in 50 mM Hepes pH 7,0) gestartet.

Wie in Abb. 41 dargestellt, folgt die Sättigung des Enzyms mit MeCob in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Bi und 500  $\mu\text{M}$  CoM einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die daraus abzuleitenden enzymatischen Parameter  $K_m$  und  $V_{\max}$  bezüglich der MeCob-Konzentration ergeben sich zu  $K_m = 1500 \mu\text{M}$  und  $V_{\max} = 0,4 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ .





**Abb. 41**  $V_{\max\text{Test}}$  [nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>] der (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion (Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 6) in Abhängigkeit von unterschiedlichen MeCob-Konzentrationen [150 – 2000 µM]. Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe Protein-Vorinkubations-Mix (jeweils 10 µg ml<sup>-1</sup> rek. MtbA, 1 µM Bi-Ammoniumcitrat und 500 µM CoM in 50 mM Hepes pH7,0) zum Reaktionsstart-Mix (MeCob) in den Reaktionsgefäßen gestartet.

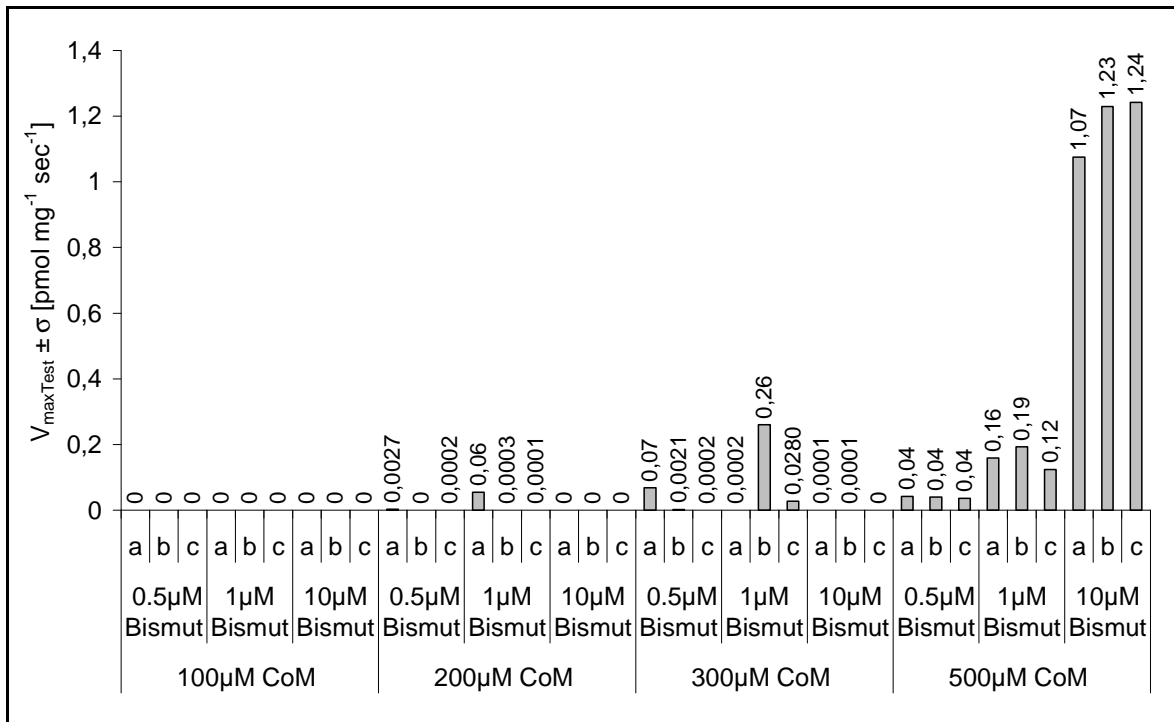
$V_{\max\text{Test}}$  von flüchtigem (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi pro mg Enzym und sec nimmt mit zunehmender Konzentration von MeCob im Ansatz deutlich zu und hat bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 2000 µM MeCob noch nicht den Sättigungsbereich erreicht. Unter den gewählten Bedingungen liegt der extrapolierte  $K_m$ -Wert für MeCob bei 1500 µM und  $V_{\max}$  bei 0,4 nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>.

### 3.7.2 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion in Abhängigkeit von der CoM-Konzentration

Die Versuche sollten Auskunft darüber geben, in welchem Konzentrationsbereich CoM für die Bismut-Methylierung wirksam ist. Hierzu wurden die  $V_{\max\text{Test}}$ -Werte der (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion in Reaktionsansätzen mit CoM-Konzentrationen von 100 µM - 500 µM CoM in Gegenwart von steigenden Bi-Konzentrationen (0,5 – 10 µM) bei bis zu 2000 µM MeCob bestimmt.

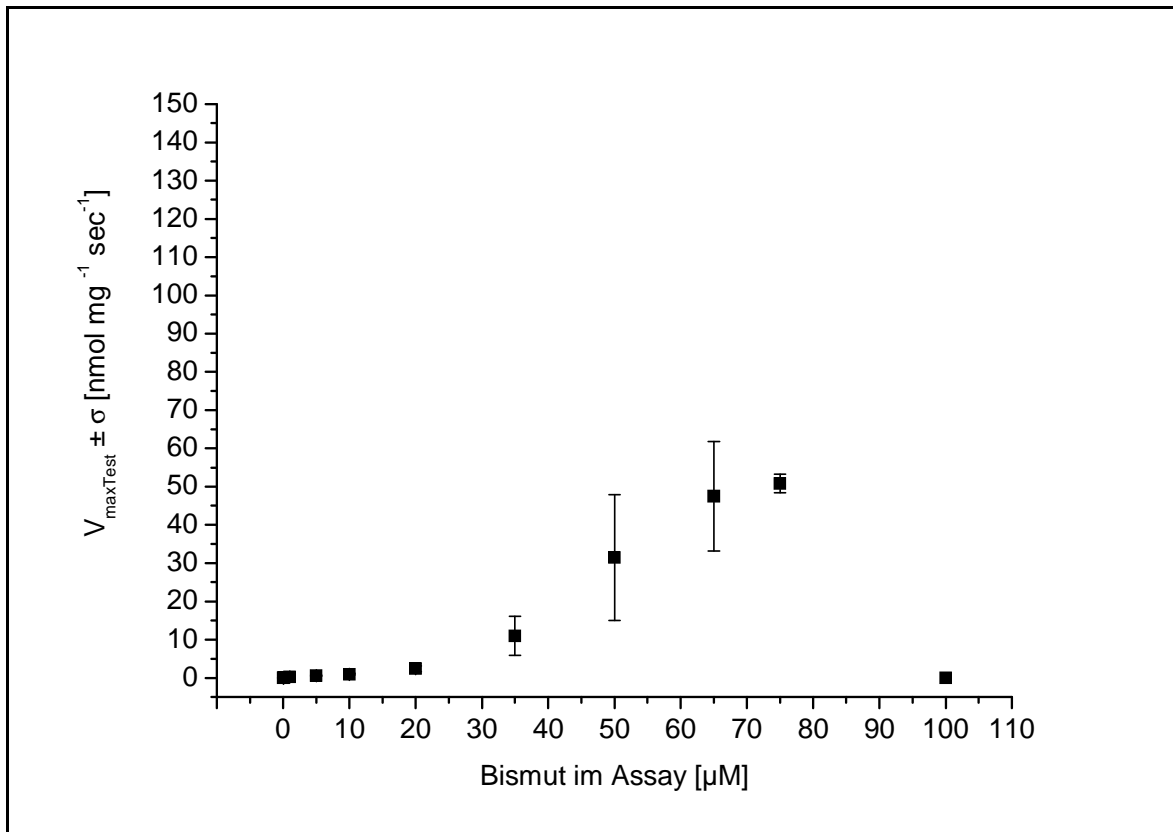
Im Unterschied zum Sättigungsverhalten gegenüber MeCob, erlauben erst Konzentrationen des Substrates CoM zwischen 300 und 500 µM messbare Umsätze mit

Bi-Konzentrationen über 1  $\mu\text{M}$ . Maximale Umsatzraten werden bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  CoM in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat erzielt (siehe Abb. 42 und Tab. 32 im Anhang). Wie Messungen der CoM-Sättigung des Enzyms über Cyanidderivatisierung des während der CoM-Methylierung entstehenden Cob(I) ergaben, entspricht dieser Wert in etwa der CoM-Halbsättigungskonzentration des Enzyms in Abwesenheit von Bismut (Thomas *et al.*, unveröffentlicht nach (Grahame 1989).



**Abb. 42**  $V_{\text{maxTest}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion in Abhängigkeit von unterschiedlichen CoM-Konzentrationen (100 – 500  $\mu\text{M}$ ) und unterschiedlichen Bi-Ammoniumcitrat-Konzentrationen (1 – 10  $\mu\text{M}$ ) jeweils in drei parallelen Ansätzen (a – c). Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des Protein-Vorinkubations-Mix (jeweils 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  rek. MtbA sowie die entsprechenden CoM- und Bi-Ammoniumcitrat-Konzentrationen) zum Reaktionsstart-Mix (MeCob) in den Reaktionsgefäßen gestartet.

Wie in Abb. 43 gezeigt, kann die Produktionsrate von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  durch Erhöhung der Bi-Konzentration auf 10 auf 75  $\mu\text{M}$  ca. 50-fach gesteigert werden. Eine weitere Erhöhung der Bi-Konzentration führt dann allerdings zu einem deutlichen Einbruch der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildungsraten, der wohl in erster Linie auf die hemmende Wirkung von Bismut auf die CoM-Methylierung des Enzyms und die damit verbundene reduzierte Produktion von Cob(I) zurückzuführen ist.



**Abb. 43**  $V_{\max\text{Test}}$  [nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>] der (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion (Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 3 – 9) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Bi-Ammoniumcitrat-Konzentrationen (0,01 – 100 μM). Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des Protein-Vorinkubations-Mix (jeweils 10 μg ml<sup>-1</sup> rek. MtbA und 500 μM CoM in 50 mM Hepes pH 7,0) zum Reaktionsstart-Mix (2000 μM MeCob) in den Reaktionsgefäßen gestartet.

Um zu überprüfen, ob eine Übertragung der Methylgruppen vom methylierten CoM auf Bismut möglich ist, wurde Methyl-CoM nach Literaturvorschrift (Gunsalus *et al.*, 1978) von Herrn Thomas. Knura, hergestellt und gereinigt. Der Testansatz enthielt 5 μM Bi-Ammoniumcitrat, 10 μg ml<sup>-1</sup> Enzym in 50 mM Hepes pH7,0 und je 500 μM Methyl-CoM und CoM und wurde durch Zugabe des Mastermix zu MeCob in das Reaktionsgefäß gestartet. Es wurden drei parallele Ansätze durchgeführt in deren Gasphase auch nach 12-stündiger Inkubation kein (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi detektiert wurde, was bedeutet, dass die Methylgruppen nicht von Methyl-CoM auf Bi-Ammoniumcitrat übergehen können.

### 3.7.3 Zeitverlauf und maximale Umsatzraten der biotischen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion in Abhängigkeit von Komponenten mit unterschiedlichem Redoxpotenzial

Die in Abschnitt 3.5 beschriebenen Versuche zur enzymatischen Methylierung von Bi-Ammoniumcitrat zu  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  lassen eine auffällige Variabilität in der Lag-Phase der Reaktion (Zeit zwischen der Komplettierung des Reaktionsansatzes und dem Erreichen von  $V_{\text{maxTest}}$ ) sowie in der Höhe von  $V_{\text{maxTest}}$  erkennen, je nach Lagerungsbedingungen, eingesetzter Konzentration des Enzyms oder der Vorinkubation mit CoM. Als mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte kommen lagerungsbedingte (möglicherweise oxidative) Schäden in Betracht. CoM könnte, zusätzlich zu seiner Funktion als Substrat der MtbA, bei Vorinkubation mit dem Enzym auch als Reduktionsmittel eine wichtige Rolle spielen. Durch die im Folgenden beschriebenen Versuche sollte diese Theorie überprüft werden und die Hintergründe der beobachteten Variabilität von Lag-Phase und  $V_{\text{maxTest}}$  aufgeklärt werden, da von ihnen wertvolle Hinweise auf den Reaktionsmechanismus der Bismut-Methylierung erwartet wurden. Dazu sollte die biotische  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion in Abhängigkeit von Komponenten mit unterschiedlichem Redoxpotenzial untersucht werden. Es wurde Enzym der Präp. I (Lagerung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) verwendet, da bei dieser Präparation die eventuellen Auswirkungen auf Lag-Phase und  $V_{\text{maxTest}}$  besonders deutlich beobachtet werden können.

Alle für die Reaktionsansätze benötigten Komponenten-Stammlösungen wurden im Anaerobenzelt über mindestens sieben Tage gegen eine Atmosphäre von 98 %  $\text{N}_2$  / 2 %  $\text{H}_2$  (v / v) äquilibriert. Die Reaktionen wurden in gas- und lichtdichten Reaktionsgefäßen unter anaerober Atmosphäre durchgeführt. Generell wurde das produzierte  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  über die Methode 2 („online“) analysiert.

Die zu testenden Komponenten wurden entweder zusammen mit dem Enzym im Protein-Vorinkubations-Mix (Vorinkubation meist 180 min) angesetzt, um ihre (möglicherweise langsame) Wirkung auf die Proteinstruktur zu testen oder gleichzeitig mit dem Reaktionsstart-Mix zum Start zugegeben, um ihre unmittelbare Wirkung auf den Reaktionsablauf erkennen zu können.

In Tab. 24 sind die Konzentrationen der Assay-Komponenten, die in allen folgenden Versuchen eingesetzt wurden, aufgelistet. Alle Reaktionsansätze enthielten als Basis-Puffer 50 mM Hepes pH 7,0.

**Tab. 24** Konzentrationen der obligat eingesetzten Assay-Komponenten

Komponente	Konzentrationen im Assay	Zeichenerklärung	
rek. MtbA Präp. I	10 µg ml <sup>-1</sup>	+  x'  !_!	vorinkubiert
Bi- Ammoniumcitrat	5 µM		vorinkubiert für x min
CoM	500 µM		
MeCob	2000 µM		Zugabe beim Reaktionsstart

Die Ergebnisse der verschiedenen Ansätze bezüglich Länge der Lag-Phase und Größe von  $V_{\max\text{Test}}$  der Bismut-Methylierung werden nachfolgend in zweidimensionalen Darstellungen in den folgenden Abschnitten (3.7.3.1 – 3.7.3.3) grafisch wiedergegeben, um Unterschiede und Übereinstimmungen zwischen den verschiedenen Ansätzen zu verdeutlichen

Außerdem sind die Ergebnisse in Tab. 33 – Tab. 35 im Anhang zusammengefasst.

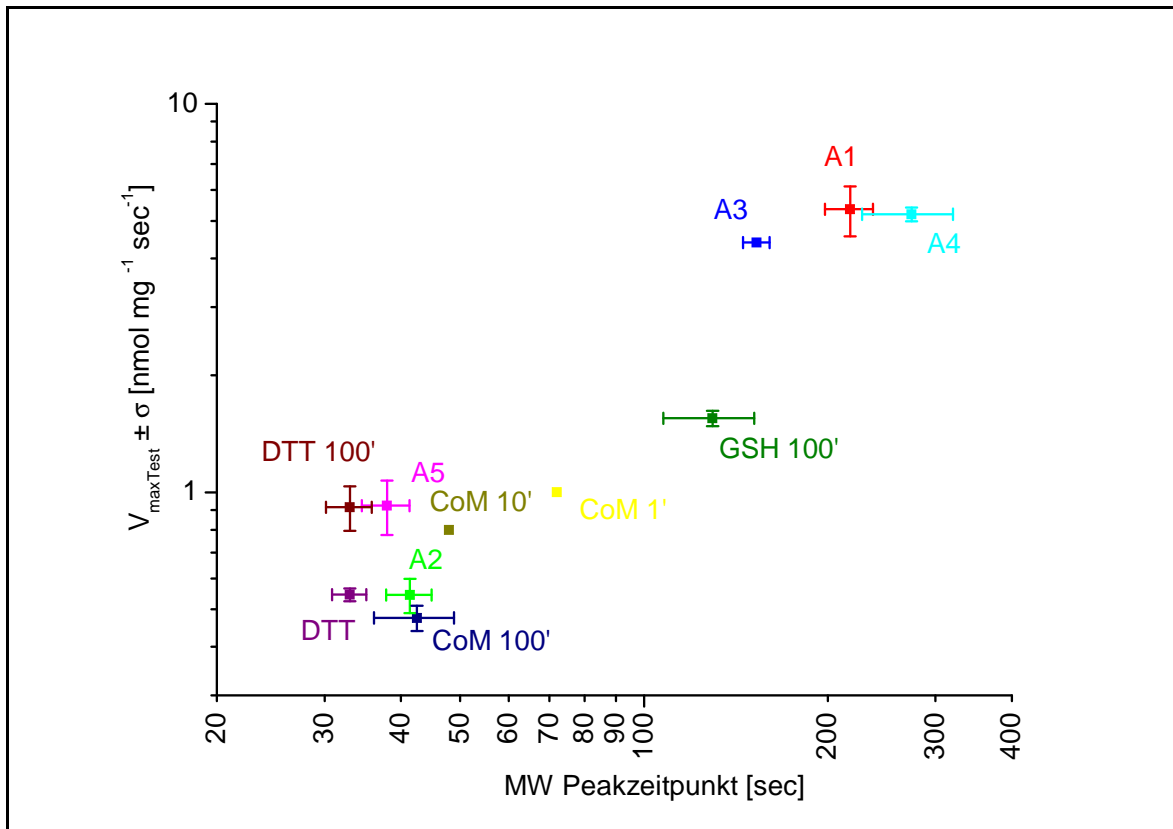
### 3.7.3.1 Einfluss der Vorinkubation der rek. MtbA mit CoM, GSH und DTT auf die enzymatische (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion

Da eine Vorinkubation des Enzyms mit dem Thilo CoM die Lag-Phase und  $V_{\max\text{Test}}$  der (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion beeinflusst, sollte in diesen Versuchen geprüft werden, ob eine Vorinkubation des Enzyms mit anderen Triolen (GSH und DTT) ebenfalls einen Einfluss auf die (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion hat. Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem das Enzym nur in Gegenwart von Hepes pH 7,0 vorinkubiert wurde. Außerdem sollte getestet werden, ob sich der Effekt von CoM auf die Bi-Methylierung durch die Anwesenheit von Bi-Ammoniumcitrat ändert.

Die Zusammensetzung der Ansätze ist in Tab. 25 aufgelistet. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Assay-Varianten sind in Abb. 44 grafisch dargestellt.

**Tab. 25**      **Komponentenzusammensetzung**      **im**      **Protein-Vorinkubations-Mix**      **und**  
**Reaktionsstart-Mix zu 3.7.3.1**

<b>Ansatz</b>	<b>Protein- Vorinkubations-Mix</b>	<b>Reaktionsstart-Mix</b>	<b>Zugabe zum Start</b>
<b>A1 (Kontrolle)</b>	MtbA	MeCob + CoM + Bi	
<b>A2</b>	MtbA + CoM	MeCob + Bi	
<b>A3</b>	MtbA + Bi	MeCob + CoM	
<b>A4</b>	MtbA + MeCob	CoM + Bi	
<b>A5</b>	MtbA + CoM + Bi	MeCob	
<b>CoM 1'</b>	Protein + CoM 1 min, 0 °C	MeCob + Bi	
<b>CoM 10'</b>	Protein + CoM 10 min, 0 °C	MeCob + Bi	
<b>CoM 100'</b>	Protein + CoM 100 min, 0 °C	MeCob + Bi	
<b>GSH 100'</b>	Protein + 500 µM GSH 100 min, 0 °C	MeCob + CoM + Bi	
<b>DTT 100'</b>	Protein + 500 µM DTT 100 min, 0 °C	MeCob + CoM + Bi	
<b>DTT</b>	Protein	MeCob + CoM + Bi	500 µM DTT



**Abb. 44**  $V_{\max\text{Test}}$  [nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>] und Lag-Phase [sec] der enzymatischen (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion durch die rek. MtbA von *M. mazei* in Gegenwart von CoM ± Bi-Ammoniumcitrat, DTT und GSH; (Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 6)

In Abb. 44 ist zu erkennen, dass die Vorinkubation des Enzyms mit Bi-Ammoniumcitrat (A3) und MeCob (A4) im Vergleich zur Kontrolle (A1) nahezu keinen Einfluss auf Lag-Phase und  $V_{\max\text{Test}}$  zeigt. Dagegen verkürzt CoM in Abwesenheit und in Gegenwart von Bi-Ammoniumcitrat (A2, A5) die Lag-Phase bei gleichzeitiger Erniedrigung von  $V_{\max\text{Test}}$ .

Eine mit CoM vergleichbare Verkürzung der Lag-Phase kann auch durch Vorinkubation mit DTT erreicht werden. Dabei macht es einen leichten Unterschied, ob DTT bereits 100 Minuten vor Reaktionsstart zum Enzym gegeben wird oder erst direkt zum Reaktionsstart.  $V_{\max\text{Test}}$  wird in beiden Fällen nach 33 sec erreicht. Allerdings ist die max. Rate im Fall der Zugabe von DTT zum Start mit 0,5 nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup> nur halb so hoch wie bei 100-minütiger Inkubation (0,9 nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>). Die Dauer der CoM-Vorinkubation hat auch einen Einfluss auf die Lag-Phase und Höhe von  $V_{\max\text{Test}}$ : bei Ansatz A1 (keine Vorinkubation) wird  $V_{\max\text{Test}}$  nach 217 sec erreicht, 1-minütige Inkubation des Enzyms mit CoM beschleunigt die Reaktion auf 72 sec (CoM 1') 10-minütige Inkubation auf 48 sec (CoM 10') und 100 min (CoM 100') bzw. 180 min (Ansatz A2) bewirken ein Erreichen von  $V_{\max\text{Test}}$  nach 42 sec). Gegenläufig dazu sinkt die Höhe von  $V_{\max\text{Test}}$  von 5,4 über 1 und 0,8 auf 0,5 nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>.

Im Vergleich zu CoM und DTT, die beide – auch bezüglich der Abhängigkeit ihrer Wirkung von der Einwirkungsdauer – sehr ähnliche Effekte zeigen, weist GSH eine geringere Wirkung auf:  $V_{\max\text{Test}}$  beträgt nach 180 min Vorinkubation des Enzyms mit GSH 1,6 nmol  $\text{mg}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  und wird nach 129,5 sec erreicht.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Wirkung von CoM ebenso wie die von DTT und GSH auf der reduzierenden Eigenschaft dieser Komponenten beruht, wenngleich man aufgrund ihrer Redoxpotenziale (CoM:  $E^0 = -139 \text{ mV}$  (Tietze *et al.* 2003), GSH:  $E^0 = -240 \text{ mV}$  (Aslund *et al.* 1997), DTT:  $E^0 = -330 \text{ mV}$  (Cleland 1964)) annehmen sollte, dass ihr Einfluss auf die Veränderung der Bi-Methylierungsreaktion in der Reihe CoM – GSH – DTT zunehmen sollte. Möglicherweise spielen bei der (angenommenen) Reduktionswirkung auch sterische Effekte eine wichtige Rolle.

### **3.7.3.2 Einfluss der nicht-thiolhaltigen Reduktionsmittel TCEP und TiCit auf die biotische $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion: Effekt der Komponenten nach Vorinkubation der rekombinanten MtbA und nach direkter Zugabe beim Reaktionsstart**

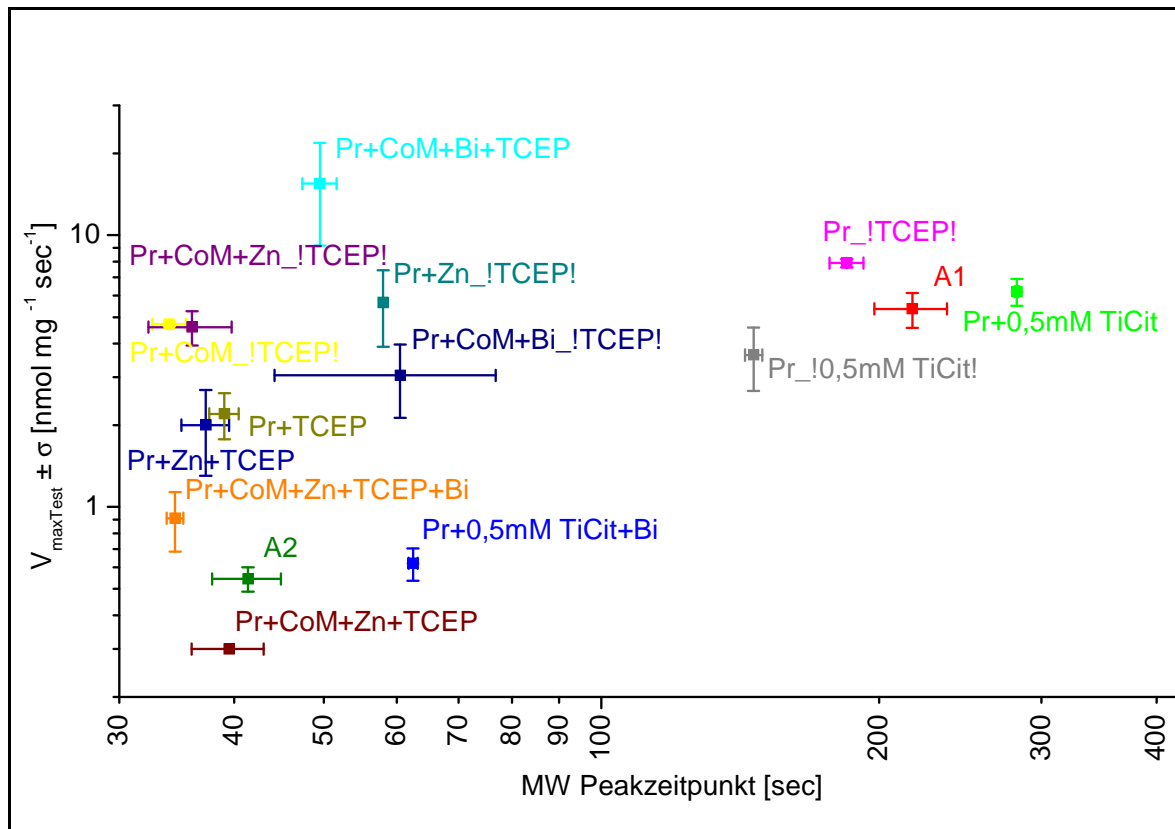
In weiteren Versuchen wurde der Einfluss der nicht-thiolhaltigen Reduktionsmittel TCEP (das Redoxpotenzial ist nicht bekannt, nach Herstellerangaben ist es elektronegativer als das Redoxpotenzial von DTT (persönliche Kommunikation mit der Firma Merck Chemicals Limited)) und TiCit ( $E^0 = -480 \text{ mV}$  (Zehnder *et al.* 1976)) auf Lag-Phase und  $V_{\max\text{Test}}$  der enzymatischen Bi-Methylierung getestet, um zu prüfen ob die unter 3.7.3.1 gezeigten Effekte von CoM, DTT und GSH im spezifischen Zusammenhang mit deren Thiolgruppen stehen. Außerdem wurde in einigen Ansätzen  $\text{Zn}(\text{SO}_4)$  zugegeben. Für die MtbA von *M. barkeri* ist bekannt, dass im aktiven Zentrum ein über Cystein- und Histidin-Reste gebundenes  $\text{Zn}^{2+}$  eine essenzielle Rolle spielt (Kruer *et al.* 2002).

Die Zusammensetzung der Ansätze ist in Tab. 26 aufgelistet. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Assay-Varianten sind in Abb. 45 grafisch dargestellt.



**Tab. 26 Varianten der Komponentenzusammensetzung im Protein-Vorinkubations-Mix und Reaktionsstart-Mix zu 3.7.3.2**

<b>Ansatz</b>	<b>Protein-Vorinkubations-Mix</b>	<b>Reaktionsstart-Mix</b>	<b>Zugabe zum Start</b>
<b>A1</b>	Protein	MeCob + CoM + Bi	
<b>A2</b>	Protein + CoM 180 min, 0 °C	MeCob + Bi	
<b>Vorinkubation mit TCEP</b>			
<b>Pr+CoM+Bi+TCEP</b>	Protein + CoM + Bi + 1 mM TCEP 180 min, 0 °C	MeCob + Bi	
<b>Pr+CoM+Zn+Bi+TCEP</b>	Protein + CoM + 100 µM Zn(SO) <sub>4</sub> + Bi + 1 mM TCEP 180 min, 0 °C	MeCob	
<b>Pr+TCEP</b>	Protein + 1 mM TCEP 180 min, 0 °C	MeCob + CoM + Bi	
<b>Pr+CoM+Zn+TCEP</b>	Protein + CoM + 100 µM Zn(SO) <sub>4</sub> + 1 mM TCEP 180 min, 0 °C	MeCob + Bi	
<b>Pr+Zn+TCEP</b>	Protein + 100 µM Zn(SO) <sub>4</sub> + 1 mM TCEP 180 min, 0 °C	MeCob + CoM + Bi	
<b>TCEP-Zugabe zum Start</b>			
<b>Pr+CoM+Bi_!TCEP!</b>	Protein + CoM + Bi 180 min, 0 °C	MeCob + Bi	1 mM TCEP
<b>Pr+CoM+Zn_!TCEP!</b>	Protein + CoM + 100 µM Zn(SO) <sub>4</sub> 180 min, 0 °C	MeCob + Bi	1 mM TCEP
<b>Pr+Zn_!TCEP!</b>	Protein + 100 µM Zn(SO) <sub>4</sub> 180 min, 0 °C	MeCob + CoM + Bi	1 mM TCEP
<b>Pr+CoM_!TCEP!</b>	Protein + CoM 180 min, 0 °C	MeCob + Bi	1 mM TCEP
<b>Pr_!TCEP!</b>	Protein	MeCob + CoM + Bi	1 mM TCEP
<b>TiCit</b>			
<b>Pr_!0.5mMTiCit!</b>	Protein	MeCob + CoM + Bi	500 µM TiCit
<b>Pr+0.5mMTiCit</b>	Protein + 500 µM TiCit 180 min, 0 °C	MeCob + CoM + Bi	
<b>Pr+0.5mMTiCit+Bi</b>	Protein + Bi + 500 µM TiCit 180 min, 0 °C	MeCob + CoM + Bi	



**Abb. 45** Einfluss nicht-thiolhaltiger Reduktionsmittel auf  $V_{\max\text{Test}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und die Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. MtbA von *M. mazei* in Gegenwart von TCEP, TiCit, CoM, Bi-Ammoniumcitrat oder  $\text{ZnSO}_4$ ; (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 6$ ) Das Enzym wurde in den verschiedenen Ansätzen zusätzlich zu den Reduktionsmitteln TiCit bzw. TCEP in unterschiedlichen Kombinationen mit CoM, Bi-Ammoniumcitrat und  $\text{Zn}(\text{SO}_4)_4$  vorinkubiert (jeweils 180 min). Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des jeweiligen Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix gestartet. Zum Vergleich sind die Varianten A1 (Protein ohne Vorinkubation) mit CoM und A2 (Enzym 180 min nur mit CoM vorinkubiert) einbezogen.

Trotz der relativ großen Standardabweichungen der Ergebnisse aus den Ansätzen mit TCEP-Zugabe kann man für die Reaktionsansätze, bei denen das Enzym mit einer oder mehreren Assay-Komponenten vorinkubiert wurde, drei grundsätzliche Aussagen treffen:

- Eine Vorinkubation der MtbA mit dem Reduktionsmittel TCEP (Ansatz „Pr + TCEP“) bewirkt, dass die Lag-Phase im Vergleich zur Kontrolle **A1** (~ 217 sec) deutlich verkürzt wird (auf ca ~ 60 bzw. 34 sec). Das entspricht dem Effekt, den CoM bei Ansatz **A2** bewirkt (Reduktion der Lag-Phase auf ~ 41 sec). Dieser Effekt wird nicht sichtbar, wenn TCEP unmittelbar mit

dem Start der Methylierungsreaktion zugegeben wird (Ansatz **Pr\_TCEP**) und spricht – wie im Fall der Thiole – für eine langsame Aktivierung der enzymatischen Reaktion durch das Reduktionsmittel.

- Wird das Protein dagegen mit anderen Komponenten vorinkubiert (vergl. **Pr+CoM+Bi\_TCEP**, **Pr+CoM+Zn\_TCEP**, **Pr+Zn\_TCEP** und **Pr+CoM\_TCEP**), entfaltet sich die stimulierende Wirkung des TCEP auf die Bi-Methylierung besser, wenn es erst zum Start zugegeben wird, anstatt dass es mit dem Enzym vorinkubiert wird (vergl. **Pr+CoM+Bi+TCEP**, **Pr+CoM+Zn+Bi+TCEP**, **Pr+CoM+Zn+TCEP** und **Pr+Zn+TCEP**).
- Überraschend ist, dass offensichtlich auch ZnSO<sub>4</sub> eine deutliche Verkürzung der Lag-Phase bewirkt (Ansatz „**Pr + Zn\_TCEP**“, bei dem nur ZnSO<sub>4</sub> als verantwortliche Komponente in Frage kommt, da TCEP erst beim Start der Reaktion zugegeben wird). Dieses Ergebnis verstärkt den Verdacht, dass die Verkürzung der Lag-Phase in Verbindung mit einer Rekonstruktion des aktiven Zentrums steht.

Für die Zugabe von TiCit zu den Reaktionsansätzen gilt:

- Weder die Zugabe zum Reaktionsstart noch die Vorinkubation des Enzyms mit TiCit hat einen deutlichen Einfluss auf die Lag-Phase und die Höhe von  $V_{\max\text{Test}}$ . Dieses Ergebnis ist unerwartet, da TiCit im abiotischen Assay in der Lage ist, die Bildung von (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi zu induzieren.
- Die gleichzeitige Vorinkubation des Enzyms mit TiCit und Bi-Ammoniumcitrat bewirkt, dass  $V_{\max\text{Test}}$  schneller erreicht wird, aber auch niedriger ist. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist unklar, möglicherweise ist eine Vorinkubation von TiCit und Bi-Ammoniumcitrat nötig, damit TiCit seine reduktive Wirkung entfalten kann.

### 3.7.3.3 Einfluss von Oxidationsmitteln auf $V_{\max\text{Test}}$ und Lag-Phase der enzymatischen (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion

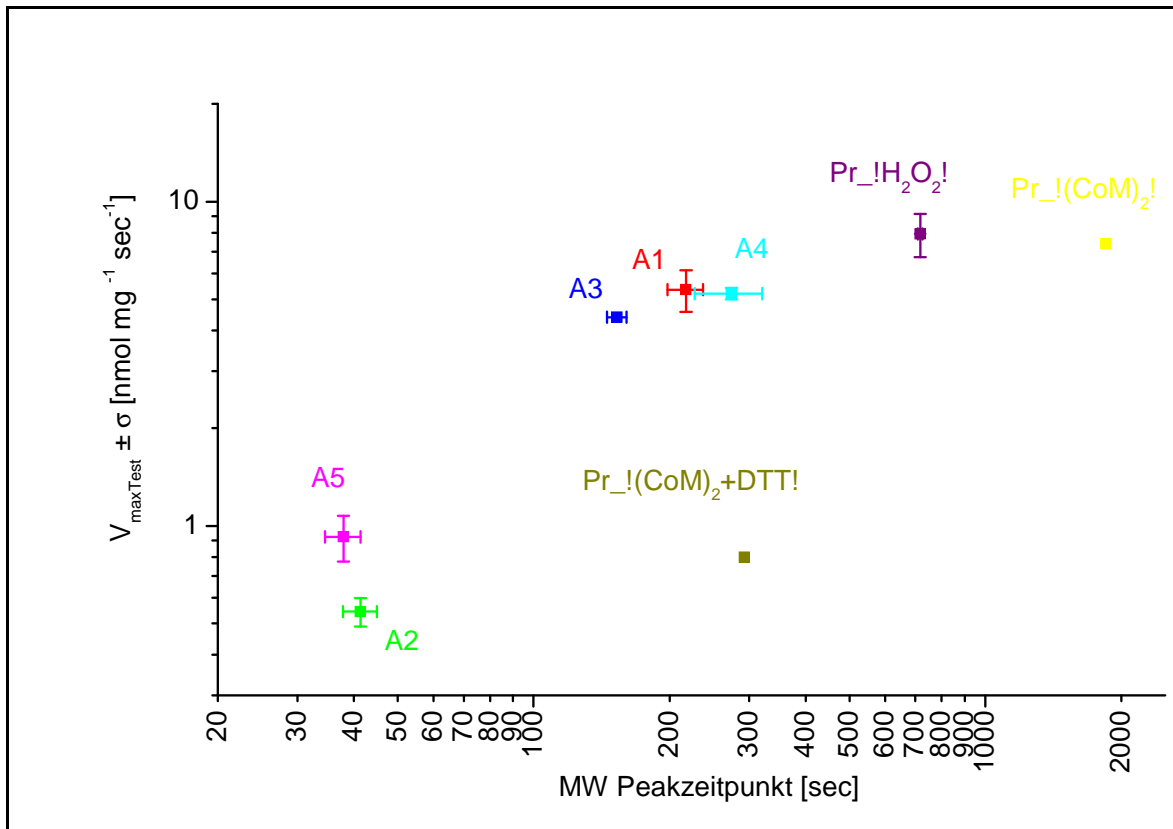
Analog zu den Variationen der *in vitro*-Assays durch Zugabe von Reduktionsmitteln wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Einfluss des Oxidationsmittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, und dem Disulfid-haltigen Reagenz (CoM)<sub>2</sub> auf die Lag-Phase und  $V_{\max\text{Test}}$  der (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Bildung untersucht.

Generell wurden die entsprechenden Reagenzien simultan mit dem Reaktionsstart der Bi-Methylierungsreaktion zugegeben.

Die Zusammensetzung der Ansätze ist in Tab. 27 aufgelistet. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Assay-Varianten sind in Abb. 46 grafisch dargestellt. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der Ansätze A1 – 5 einbezogen.

**Tab. 27 Varianten der Komponentenzusammensetzung im Mastermix und den Reaktionsgefäßen zu 3.7.3.3**

<b>Ansatz</b>	<b>Protein-Vorinkubations-Mix</b>	<b>Reaktionsstart-Mix</b>	<b>Zugabe zum Start</b>
<b>A1</b>	Protein	MeCob + CoM + Bi	
<b>A2</b>	Protein + CoM	MeCob + Bi	
<b>A3</b>	Protein + Bi	CoM + MeCob	
<b>A4</b>	Protein + MeCob	CoM + Bi	
<b>A5</b>	Protein + CoM + Bi	MeCob	
<b>Pr_!(CoM)<sub>2</sub></b>	Protein	MeCob + CoM + Bi	500 µM (CoM) <sub>2</sub>
<b>Pr_!H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>!</b>	Protein	MeCob + CoM + Bi	500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Pr_!(CoM)<sub>2</sub> + DTT!</b>	Protein	MeCob + CoM + Bi	500 µM (GSH) <sub>2</sub> + 500 µM DTT



**Abb. 46** Einfluss der Oxidationsmittel  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $(\text{CoM})_2$  auf  $V_{\max\text{Test}}$  [nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>] und die Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. Mtba von *M. mazei*; (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 6$ ). Die Oxidationsmittel wurden simultan zum Reaktionsstart zugegeben. Zum Vergleich sind die Reaktionsansätze A1 – 5 einbezogen. Die Bismut-Methylierungs-Assays wurden durch Zugabe des jeweiligen Protein-Vorinkubations-Mix zum Reaktionsstart-Mix gestartet.

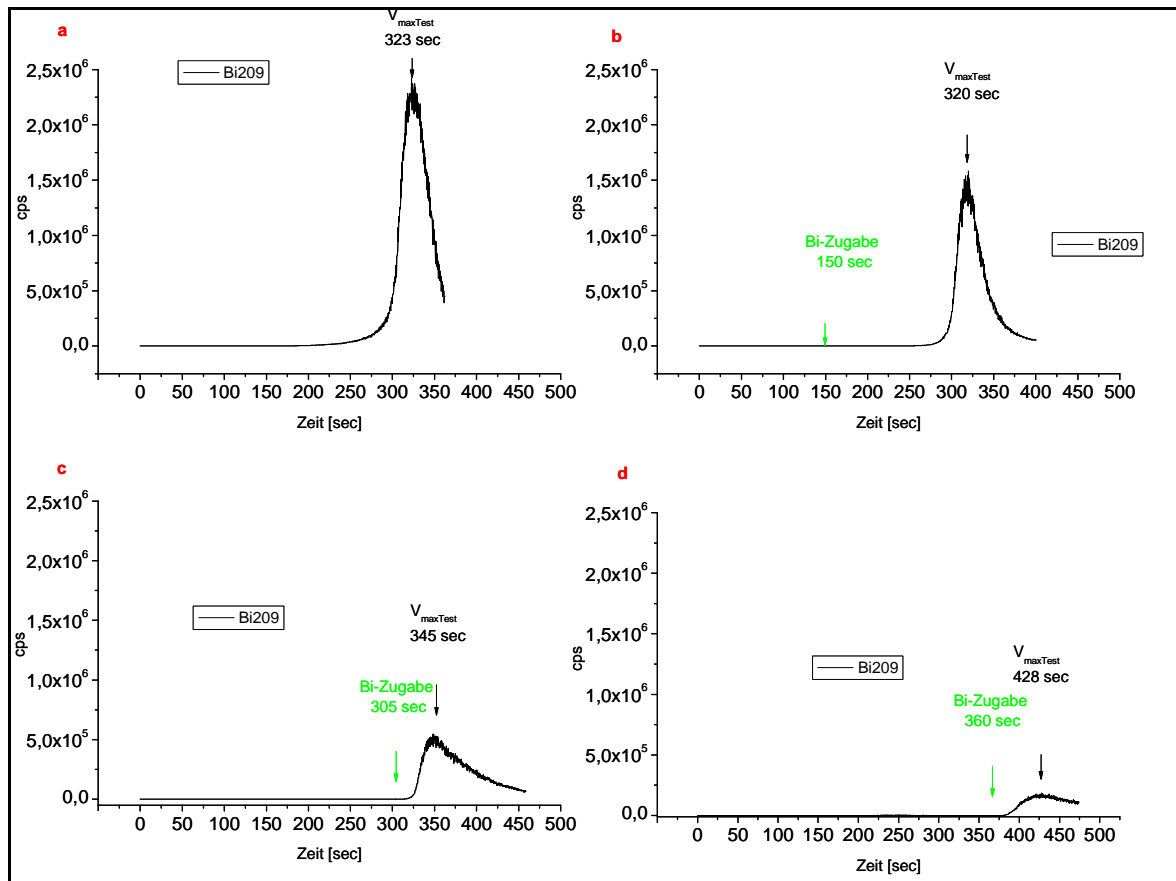
In Abb. 46 ist deutlich zu erkennen, dass die Zugabe von Oxidationsmitteln zum Reaktionsstart der Bismut-Methylierungsreaktion einen – im Vergleich zur Zugabe von Reduktionsmitteln – gegenteiligen Effekt hat. Die Oxidationsmittel  $(\text{CoM})_2$  bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$  bewirken, dass  $V_{\max\text{Test}}$  wesentlich später erreicht wird (1851,5 sec und 718 sec) und deutlich höher sind (7,4 nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup> und 79,5 nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>) sowohl im Vergleich zu A2 und A5 als auch im Vergleich zu den – ohnehin späten – Ansätzen A1, A3 und A4. Bei gleichzeitiger Zugabe von  $(\text{CoM})_2$  und DTT wird der verzögernde und Umsatz-stimulierende Effekt des Oxidationsmittels durch DTT teilweise aufgehoben. Das ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass alle unter 3.7.3 beschriebenen Effekte auf die Einwirkung von Reduktions- bzw. Oxidationsmitteln auf das Enzym zurückzuführen sind.

### 3.8 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion in Abhängigkeit vom Zugabezeitpunkt des Bi-Ammoniumcitrats

Wie in den Abschnitten 3.5 und 3.7 beschrieben, hängt die Höhe der max. (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktionsrate und der Zeitpunkt, zu dem sie erreicht wird, von der Konzentration und / oder vom Oxidationszustand des Enzyms ab. Bei geringer Enzymkonzentration oder in Gegenwart von Oxidationsmitteln ist die (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Bildung verzögert und die max. Rate höher als bei hoher Enzymkonzentration oder in Anwesenheit von Reduktionsmitteln. Wie in 3.6 beschrieben, ist in Ansätzen ohne Bismut bei geringerer Enzymkonzentration auch die max. Rate der Demethylierung von MeCoB und damit der Methylierung von CoM verzögert und niedriger. Offensichtlich laufen während der CoM-Methylierung bestimmte Vorreaktionen ab, die Voraussetzung für die Bismut-Methylierung sind. Wie bereits erwähnt, könnte die Bildung von Cob(I) während der Methylierung von CoM der für die Bismut-Methylierung limitierende Schritt sein. Das würde bedeuten, dass die max. (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktionsraten weitgehend unabhängig vom Zeitpunkt der Bi-Ammoniumcitrat-Zugabe erreicht werden sollten. Die im folgenden Abschnitt 3.8 dokumentierten Versuche wurden durchgeführt, um diese Hypothese zu überprüfen.

#### 3.8.1 Bismutzugabe vor Erreichen der max. (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktionsrate V<sub>maxTest</sub> im Kontrollansatz

Die hier beschriebenen Bismut-Methylierungs-Ansätze wurden mit Enzymkonzentration (Präp. I) von 10 µg ml<sup>-1</sup> durchgeführt. Die Assays enthielten je 500 µM CoM und 2000 µM MeCoB und wurden durch Zugabe des Enzyms gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration 5 µM) zugegeben. Als Kontrolle wurde gleichzeitig mit dem Enzym Bi-Ammoniumcitrat zum Ansatz gegeben (Endkonzentration 5 µM) (Abb. 47 a). Die Ergebnisse der (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktions-Zeitpunkte und -Raten in Abb. 47 b – d zeigen nach Zugabe von Bi-Ammoniumcitrat 150, 305 und 360 sec nach dem Reaktionsstart mit Enzym. In Tab. 28 sind die Ergebnisse zusammengefasst.



**Abb. 47** ,Online'-ICP-MS-Messungen von *in vitro*-Bismut-Methylierungs-Assays mit 500  $\mu\text{M}$  CoM und 2000  $\mu\text{M}$  MeCoB ( $n = 2$ ). Alle Ansätze wurden durch Zugabe des Enzyms (Endkonzentration 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) zum Zeitpunkt 0 sec gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wird Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration 5  $\mu\text{M}$ ) zugegeben.

a = Kontroll-Ansatz; Zugabe von Bi-Ammoniumcitrat zum Startzeitpunkt

b = Zugabe von Bi-Ammoniumcitrat 150 sec nach dem Reaktionsstart

c = Zugabe von Bi-Ammoniumcitrat 305 sec nach dem Reaktionsstart

d = Zugabe von Bi-Ammoniumcitrat 360 sec nach dem Reaktionsstart

**Tab. 28**  $V_{\max\text{Test}}$  [pmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>] und die Lag-Phase [sec] nach Reaktionsstart, (jeweils mit Standardabweichungen, n = 3) nach Zugabe von Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration 5  $\mu\text{M}$ ) zu verschiedenen Zeitpunkten. Alle Bismut-Methylierungs-Assays enthielten 500  $\mu\text{M}$  CoM, 2000  $\mu\text{M}$  MeCob in 50 mM Hepes pH 7,0 und wurden durch Zugabe des geschädigten Enzyms (Endkonzentration 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) gestartet.

	$V_{\max\text{Test}} \pm \sigma$ [nmol mg <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ]	Lag-Phase $V_{\max\text{Test}} \pm \sigma$ [sec]
<b>Kontrolle (Bi zum Start)</b>	31,1 $\pm$ 1,8	7,6 $\pm$ 0,5
<b>Bi 150sec nach dem Start</b>	17,6 $\pm$ 0,8	5,3 $\pm$ 0,8
<b>Bi 305sec nach dem Start</b>	5,9 $\pm$ 1	1,6 $\pm$ 0,2
<b>Bi 360sec nach dem Start</b>	6,5 $\pm$ 0,5	1 $\pm$ 0,5

In den Abb. 47 a und b ist zu erkennen, dass  $V_{\max\text{Test}}$  in beiden Fällen zum gleichen Zeitpunkt (320 sec) erreicht wird, unabhängig davon, ob Bi-Ammoniumcitrat zum Reaktionsstart oder 150 sec später zugegeben wird.

Wird das Substrat zu einem Zeitpunkt zugegeben, zu dem die (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Bildung in der Kontroll-Reaktion schon beginnt, wenn Bismut von Anfang an enthalten ist, beginnt die (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Bildung nahezu unmittelbar (Zugabezeitpunkt 306 bzw. 360 sec nach Start; vergleiche Abb. 47 c und d):  $V_{\max\text{Test}}$  bei 345 sec bzw. 428 sec. Allerdings wird die Höhe der max. (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktionsrate geringer, je später Bi-Ammoniumcitrat zugegeben wird (vergleiche Tab. 28). Diese Beobachtung ist kompatibel mit der Annahme, dass als Voraussetzung für die Produktion von (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi eine von Bismut unabhängige Enzym-Reaktion (Methylierung von CoM und gleichzeitige Bildung von Cob(I)) ablaufen muss. Um zu erklären, dass die Produktionsraten bei zunehmend späteren Bismut-Zugaben deutlich abnehmen, könnte man annehmen, dass hier der Methyl donor (MeCob) oder das für die Methylierung von Bismut erforderliche Intermediat (wahrscheinlich Cob(I)) nicht mehr in ausreichender Konzentration zur Verfügung stehen.

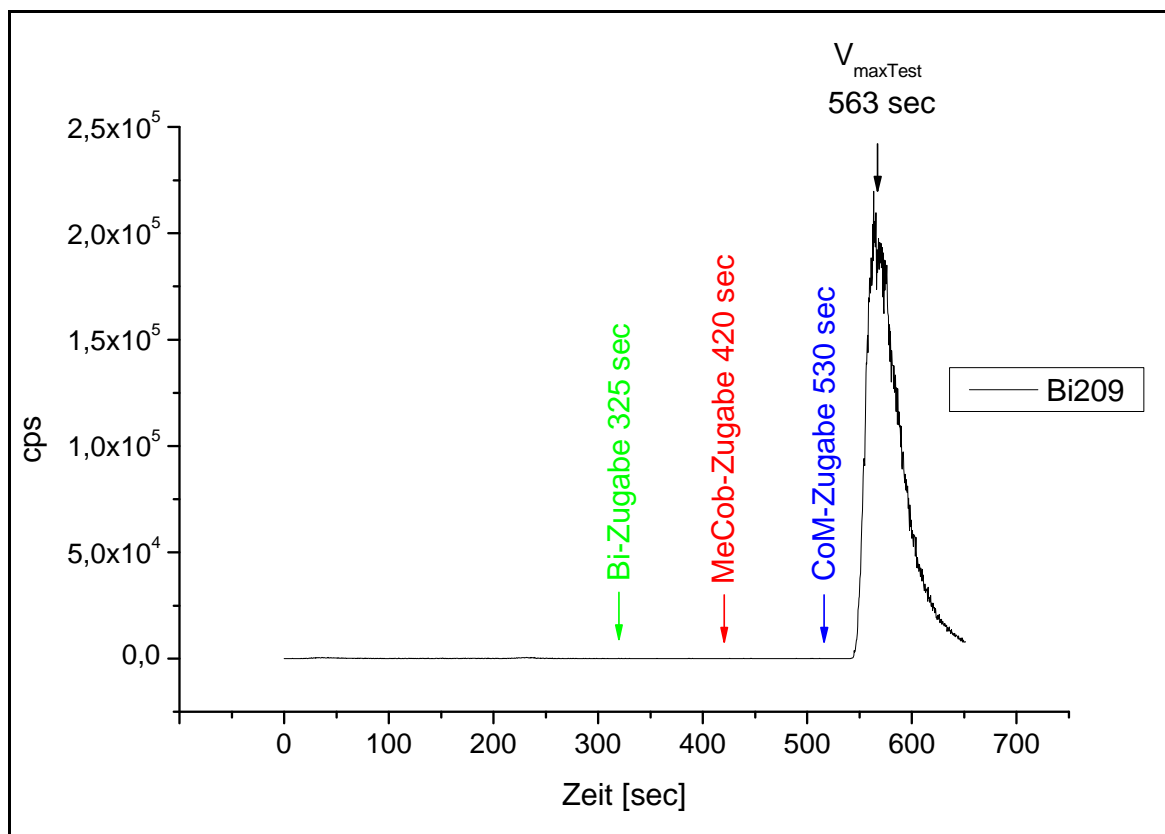
### 3.8.2 Bismutzugabe nach Erreichen der max. (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktionsrate $V_{\max\text{Test}}$ im Kontrollansatz

In einem weiteren Versuch wurde Bi-Ammoniumcitrat erst nach 325 sec zugegeben, d. h. zu einer Zeit, die hinter dem Zeitpunkt des Maximums der (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion liegt.

In diesem Fall konnte keine (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion detektiert werden. Auch anschließende Zugabe von MeCob (Endkonzentration 4000  $\mu\text{M}$ ) bewirkte keine (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion. Erst nach Zugabe von CoM (Endkonzentration 1000  $\mu\text{M}$ ) setzte wieder (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion

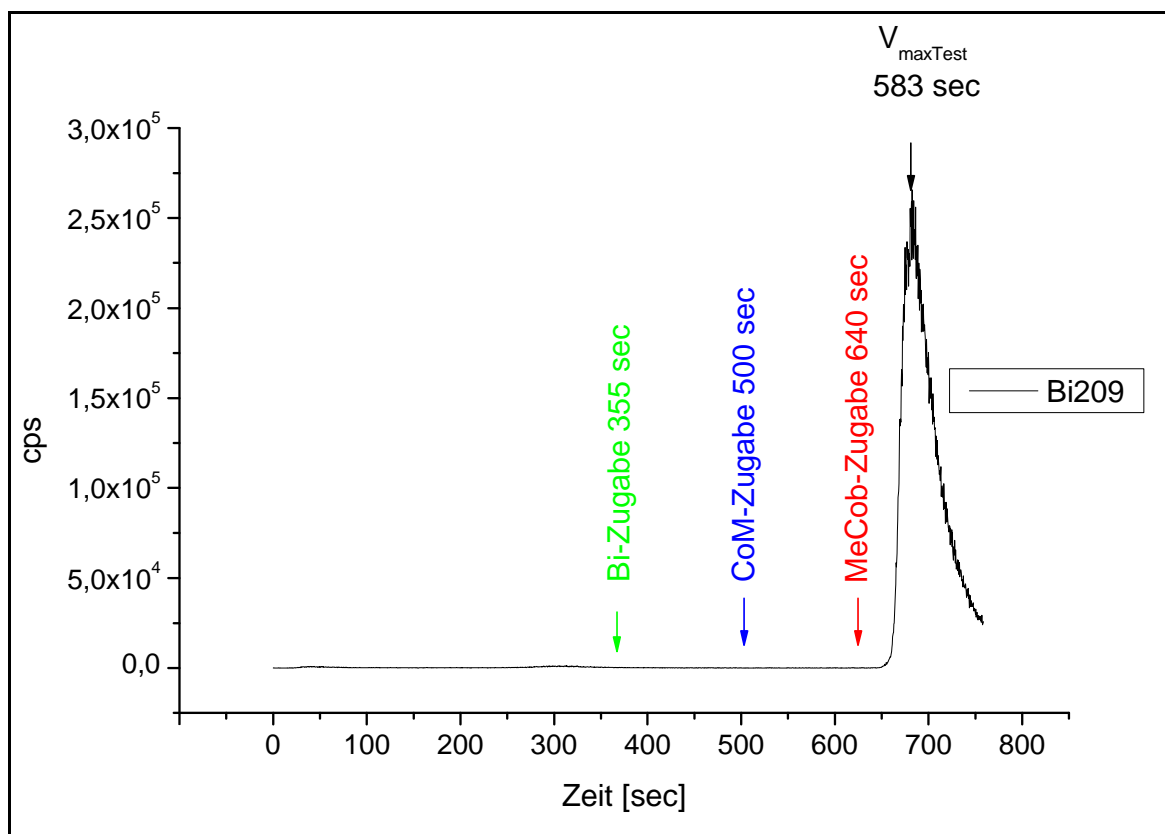


ein. Wie in Abb. 48 zu sehen ist, wurde die max.  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktionsrate ( $1 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ) bereits 33 sec nach CoM-Zugabe erreicht. Offensichtlich waren zum Zeitpunkt der Bi-Ammoniumcitrat- und MeCob-Zugabe CoM und das entstandene Cob(I) aufgebraucht. Erst durch erneute Zugabe von CoM konnte die  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung induziert werden.



**Abb. 48** ,Online'-ICP-MS-Messungen von *in vitro*-Bismut-Methylierungs-Assays mit  $500 \mu\text{M}$  CoM und  $2000 \mu\text{M}$  MeCob. Alle Ansätze wurden durch Zugabe des Enzyms (Endkonzentration  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) gestartet. Nach 325 sec wurde Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration  $5 \mu\text{M}$ ) zugegeben, nach 420 sec MeCob (Endkonzentration  $4000 \mu\text{M}$ ) und nach 530 sec CoM (Endkonzentration  $1000 \mu\text{M}$ ).

Parallel wurde ein zweiter Versuchsansatz mit verringerter MeCob-Konzentration (Endkonzentration  $2000 \mu\text{M}$ ) durchgeführt, um zu erreichen, dass zum Zeitpunkt der Bi-Ammoniumcitrat-Zugabe der Methyl donor aufgebraucht ist. Die Konzentrationen der anderen Reaktanten wurden beibehalten. Der Verlauf der Reaktion ist in Abb. 49 dargestellt. Nach Zugabe von Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration  $5 \mu\text{M}$ ) sowie nach Zugabe von CoM (Endkonzentration  $1000 \mu\text{M}$ ) konnte keine  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion detektiert werden. Erst nach weiterer Zugabe von MeCob (Endkonzentration  $2200 \mu\text{M}$ ) konnte 43 sec danach eine  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung beobachtet werden.



**Abb. 49** ,Online'-ICP-MS-Messung eines *in vitro*-Bismut-Methylierungs-Assays mit 500  $\mu\text{M}$  CoM und 2000  $\mu\text{M}$  MeCob ( $n = 3$ ). Der Ansatz wurde durch Zugabe des Enzyms (Endkonzentration 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) gestartet. Nach 355 sec wurden Bi-Ammoniumcitrat (Endkonzentration 5  $\mu\text{M}$ ) zugegeben, nach 500 sec CoM (Endkonzentration 1000  $\mu\text{M}$ ) und nach 640 sec MeCob (Endkonzentration 2200  $\mu\text{M}$ ).

Die dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  nur gleichzeitig mit der CoM-Methylierung stattfinden kann. Sind die Edukte für diese Reaktion verbraucht wird keine  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung mehr festgestellt. Offenbar wird auch das entstehende Cob(I) aufgebraucht, unabhängig davon ob Bi-Ammoniumcitrat im Ansatz enthalten ist oder nicht. Eventuell kann Cob(I) unter den gewählten *in vitro* Bedingungen Methylgruppen von MeCob auf CoM übertragen. Erst durch die erneute Zugabe der Reaktionskomponenten kann weitere  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion erfolgen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Rolle der Darmmikrobiota des Säugetierorganismus bei der Derivatisierung und Verteilung von Metall(oid)en

Der erste Teil dieser Arbeit sollte dazu beitragen, die Bedeutung mikrobieller Biomethylierung im Säugerorganismus zu klären. Prokaryoten, besonders methanogene Archaea anaerober Habitats, zeichnen sich durch ein hohes Potenzial aus, Metalle und Metalloide, wie Arsen, Antimon, Bismut, Selen, Tellur und Quecksilber zu methylieren (Gadd 1993; Michalke *et al.* 2000; Bentley *et al.* 2002; Michalke *et al.* 2002b; Thayer 2002; Craig 2003; Michalke *et al.* 2004; Meyer *et al.* 2007; Michalke *et al.* 2007; Meyer *et al.* 2008). Der menschliche sowie tierische Darm bietet als wohltemperiertes, mit Nährstoffen gut versorgtes, anaerobes Habitat einer Vielzahl von *Bacteria* und *Methanoarchaea* einen Lebensraum und damit auch die Grundlage zur Verwirklichung ihrer metabolischen Fähigkeiten einschließlich der Biomethylierung von Metallen und Metalloiden. In dieser Arbeit dienten Mäuse als Modellorganismen, um herauszufinden, wie oral aufgenommenes Bismut im Säugetier-Organismus verteilt wird. Ziel war es zu klären, inwieweit die Darmmikrobiota für die Transformation von Bismut zu flüchtigen, methylierten Derivaten verantwortlich ist.

Die zweiwöchigen Fütterungsexperimente mit Bismut-angereichertem Futter wurden an konventionell gezogenen Mäusen (KONV-Gruppe) mit intakter Darmmikrobiota und an keimfreien Mäusen (KF-Gruppe) durchgeführt. Als Kontrolle dienten konventionell gezogene Mäuse, die mit Standardfutter ohne Bismut gefüttert wurden (KONV-Kontroll-Gruppe). Den Mäusen wurde durch Herzpunktion Blut entnommen und dessen Gehalt an  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  mittels PT-GC-ICP-MS-Analyse bestimmt.

Um herauszufinden, ob die physikochemische Form des Bismuts einen Effekt auf die Resorption und Verteilung im Organismus hat, wurden Lunge, Leber, Nieren, Hoden und Hirn der Mäuse entnommen und der Bismutgehalt dieser Gewebe mittels ICP-MS-Analyse bestimmt.

#### 4.1.1 Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ im Blut von KONV- und KF-Mäusen nach Fütterung mit Bismut-haltigem Futter

Bei der PT-GC/ICP-MS-Analyse der Blutproben nach 14-tägiger Fütterung mit Bismut-haltigem Futter konnte lediglich im Blut der KONV-Gruppe flüchtiges  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  nachgewiesen werden. Weder im Blut der KF- noch der KONV-Kontroll-Gruppe konnte diese Verbindung detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es einen klaren Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Mikroorganismen im Darm und der Bildung permethylierter Bismutderivate gibt.

Die detektierten Mengen des flüchtigen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  in den einzelnen Proben innerhalb der KONV-Gruppe lagen zwischen 6,2 und 71,4 fmol g<sup>-1</sup> FG (Tab. 16). Die Ursache für diese recht starken Schwankungen liegt wahrscheinlich zum einen darin begründet, dass selbst bei den verwendeten Inzuchtmäusen die Zusammensetzung der Darmmikrobiota nicht identisch ist. Zum anderen könnten Zeitpunkt und Dauer der Blutprobennahme zu Verlusten von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  geführt haben. In Humanstudien konnte gezeigt werden, dass die maximale Bismutkonzentration im Blut bereits 30 Minuten nach Einnahme einer therapeutischen Dosis kolloidalen Bismutsubcitrats erreicht ist (Hespe *et al.* 1988), gefolgt von einem schnellen Abfall ( $t_{1/2} \sim 60$  min) (Newton *et al.* 2001). Die Menge an Bismut im Blut und möglicherweise auch die Menge an  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ , das vom Darm ins Blut übergegangen ist, hängt also vom Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme der Maus ab.

#### **4.1.2 Bestimmung des Gesamtbismutgehaltes in Leber, Lunge, Nieren, Hoden und Hirn von Tieren der KONV- und KF-Gruppe nach Fütterung mit Bismut-haltigem Futter**

Die Bestimmung des Bismutgehaltes in den Organen der Versuchstiere diente dazu festzustellen, ob die physikochemische Form des Metalls einen Einfluss auf seine Verteilung von Bi in den verschiedenen Organen des Säugerorganismus hat, da anzunehmen war, dass das permethylierte Derivat dieses Metalls aufgrund seiner größeren Hydrophobizität und damit seiner höheren Membran-Permeabilität leichter in die verschiedenen Gewebe aufgenommen wird.

In allen Organen der KONV-Gruppe konnte wesentlich mehr Bismut nachgewiesen werden als in den Organen der KF-Gruppe. Lediglich der Bismutgehalt der Nieren beider Gruppen liegt auf einem ähnlichen Niveau, was vermutlich darin begründet ist, dass der Großteil des aufgenommenen Bismuts über die Nieren in (anorganischer Form) ausgeschieden wird (Sun *et al.* 2004) und sich damit auch die KONV- und KF-Gruppe nicht deutlich im Bismut-Gehalt in der Niere unterscheiden sollten (Tab. 17). Bei beiden Gruppen findet sich der größte Bismutgehalt (abgesehen von den Nieren) in der Leber und der Lunge, gefolgt von den Hoden und dem Hirn. Dieser Befund entspricht Literaturdaten bezüglich der Bismut-Akkumulierung in den Organen von Ratten nach intramuskulärer Injektion einer CBS-Lösung (2x wöchentlich  $630 \mu\text{g kg}^{-1}$  Körpergewicht über 70 d). Das meiste Bismut wurde in dieser Studie ebenfalls in den Nieren nachgewiesen, gefolgt von Leber, Knochen, Lunge, Milz, Gehirn und Herz (Luppino *et al.* 1995). In den Geweben der KONV-Kontroll-Gruppe wurden erwartungsgemäß lediglich geringe Mengen Bismut gefunden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das im Darm gebildete  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  über das Blut effizienter im Organismus verteilt und in den Organen angereichert wird. In welcher Form Bismut in den verschiedenen Organen abgelagert wird, ist noch nicht bekannt und bedarf noch weiterer Untersuchungen. Ebenfalls offen ist die Frage nach der toxischen Wirkung der in den jeweiligen Organen abgelagerten Bismut-Verbindungen. Da  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  auch im Blut, Urin und Stuhl menschlicher Probanden nachgewiesen werden konnte (Michalke *et al.* 2008) und man somit annehmen kann, dass sich Bismut in diesen Fällen auch in den Organen akkumuliert, sollte der Einsatz von Bismut in allen Bereichen mit engem humanen Kontakt aufgrund dieser Befunde überdacht und wenn möglich eingeschränkt werden, da die langfristigen Folgen nicht abzuschätzen sind.

Anders als erwartet gibt es keine quantitative Beziehung zwischen der Konzentration von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  im Blut einer KONV-Untergruppe und dem Bismutgehalt in den entsprechenden Organen (Abb. 12).

Es wäre allerdings möglich, dass eine deutliche Korrelation erst oberhalb einer bestimmten Konzentration von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  im Blut sichtbar wird. Nicht auszuschließen ist auch, dass weitere von der intestinalen Mikrobiota produzierte, aber noch nicht identifizierte Derivate von Bismut gebildet werden und ins Blut gelangen, die für die sichtbare Anreicherung von Bismut in den Organen (zusätzlich) verantwortlich sind.

Im Verdacht stehen hier insbesondere nicht-flüchtige teilmethylierte Bi-Derivate. Außerdem sollte überprüft werden, ob Alter, Geschlecht, Medikamente und Ernährung einen Einfluss auf die Bismut-Methylierung haben, da diese Faktoren Einfluss auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota haben (Per *et al.* 1998; Hooper *et al.* 1999; Hayashi *et al.* 2002; Bartosch *et al.* 2004; Mueller *et al.* 2006).

## **4.2 Untersuchungen zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Bismut-Methylierung in *M. mazei***

Hauptziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war es, Einblick in den Mechanismus zu erhalten, der für die Transformation von  $\text{Bi}^{\text{III}}$  zum flüchtigen Derivat  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  in *M. mazei* verantwortlich ist. Von der Aufklärung der entsprechenden Zusammenhänge wurden auch Hinweise erwartet, die die präferierte Befähigung der Methanoarchaea erklären können, Metalle und Metalloide zu flüchtigen Derivaten zu transformieren (Meyer *et al.* 2008).

#### 4.2.1 Abiotische (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Bildung

Grundsätzlich können abiotische (nicht-enzymatische) und biotische (enzymatische) Reaktionen für die beobachtbare Methylierung von Bi<sup>III</sup> zum permethylierten Produkt (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi verantwortlich gemacht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die nicht-enzymatische Bildung von (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi in abiotischen *in vitro*-Ansätzen untersucht. Es zeigte sich, dass ausgehend von MeCob zwei unterschiedliche Reaktionswege zur abiotischen Bildung von (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi führen:

1) Aus der Literatur ist bekannt, dass die Belichtung von MeCob zu einer homolytischen Spaltung der Methyl-Cobalt-Bindung führt (Hogenkamp 1966; Yamada *et al.* 1966a; Yamada *et al.* 1966b; Pratt *et al.* 1971) und für Zinn konnte gezeigt werden, dass Methylradikale, die durch fotochemisch induzierte Homolyse aus CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub> entstanden sind zur Bildung von Methylzinn führen (Malinovsky *et al.* 2009).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist diese Reaktion auch bei der Methylierung von Bi<sup>III</sup> beobachtbar. Ein Beleg für den radikalischen Mechanismus dieser Methylierung ist die komplette Unterdrückung der Reaktion durch den Radikalfänger tert. Butanol (3.2.1).

2) Zum anderen konnte gezeigt werden, dass auch eine nicht-enzymatische Transmethylierung von MeCob auf Bi<sup>III</sup> in Gegenwart der Reduktionsmittel TiCit (E<sup>0</sup> = -480 mV (Zehnder *et al.* 1976)) oder Cob(I) (E<sup>0</sup> = -600 mV (Lexa *et al.* 1977; Dryhurst *et al.* 1982; Lexa *et al.* 1983)) möglich ist (ohne Belichtung). Offensichtlich sind beide Reduktionsmittel in der Lage, Methylgruppen von MeCob in ‚reaktiver Form‘ abzuspalten, die dann an Bismut binden. Es ist wahrscheinlich, dass die Methylgruppe als Carbanion auf Bi<sup>III</sup> übertragen wird. Ein radikalischer Mechanismus scheint – wenn überhaupt – eine untergeordnete Rolle bei diesem Methyl-Transfer zu spielen, da beide Reaktionen in Gegenwart von tert. Butanol nur leicht gehemmt werden.

Besondere Bedeutung kommt der Wirkung von Cob(I) zu, der demethylierten Zustandsform des Cobalamins, das als Nebenprodukt der enzymatischen MeCob-abhängigen Methylierung von CoM auftritt. Wie später weiter ausgeführt wird, scheint Cob(I) auch eine entscheidende Rolle bei der enzymatischen Bismut-Methylierung zu spielen. Möglicherweise trägt TiCit zur Bildung von Cob(I) bzw. zur Stabilisierung von Cob(I) bei.

In Abb. 50 sind mögliche Reaktionsmodelle für die Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  in Gegenwart von TiCit und Cob(I) dargestellt und in Abb. 51 und Abb. 52 sind die entsprechenden Reaktionsgleichungen wiedergegeben.

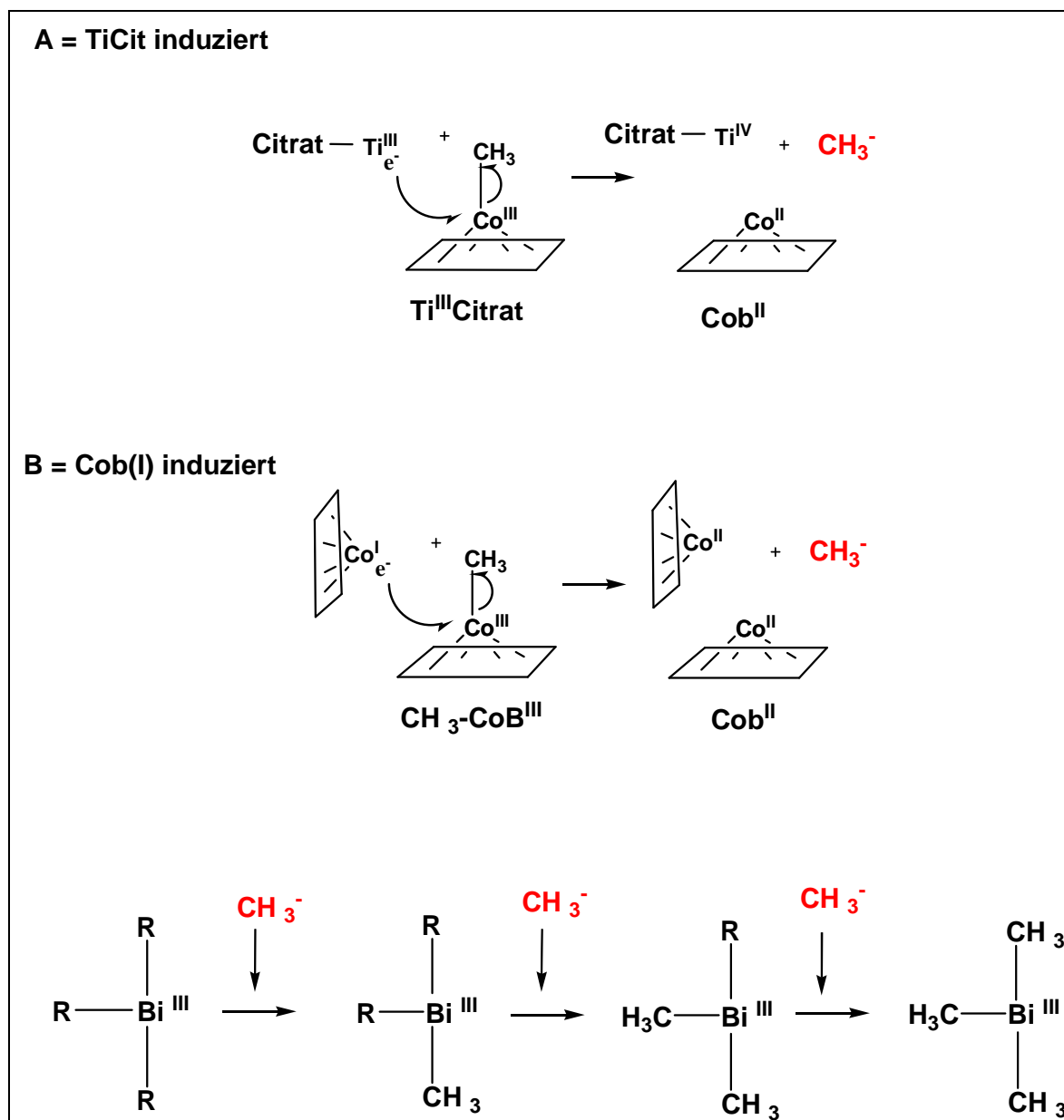


Abb. 50 Hypothetisches Reaktionsschema der TiCit- bzw. Cob(I)- induzierten  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung

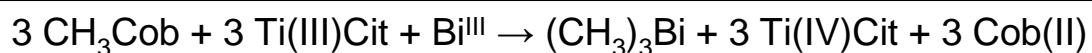


Abb. 51 Hypothetische Reaktionsgleichung der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung in Gegenwart von TiCit.



Abb. 52 Hypothetische Reaktionsgleichung der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung in Gegenwart von Cob(I).



#### 4.2.2 Biotische $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung

Aus Versuchen mit dialysierten Rohextrakten von *M. mazei* wurde geschlossen, dass auch enzymatische Reaktionen für die Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  verantwortlich sein müssen (3.2.4). Wie diese Versuche ergaben, ist die Produktion von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  an die Gegenwart von MeCob und CoM gebunden und der Verdacht lag nahe, dass Methyltransferasen der Methanogenese (z. B. MtbA und MtaA) an diesen Umsetzungen beteiligt sind, deren transmethylierende Aktivität von beiden Coenzymen (MeCob und CoM) abhängt.

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen zur enzymatischen Bismut-Methylierung wurden *M. mazei*-Kulturen verwendet, die auf Trimethylamin als Methyl donor der Methanogenese adaptiert waren. So konnte gewährleistet werden, dass die methyltransferierenden Enzyme (besonders die MtbA) dieses Stoffwechselweges, die am Methyltransfer auf CoM, dem essenziellen Coenzym der Methanogenese, beteiligt sind, in ausreichend hoher Kopienzahl in der Zelle vorlagen.

Mit Hilfe verschiedener aufeinander folgender Chromatografien (Q-Sepharose-, Hydroxylapatit- und Größenausschluss-Chromatografie) konnten aus diesen Rohextrakten von *M. mazei* Bismut-methylierende Proteinfractionen angereichert werden. Diese zeigten im SDS-Gel zwei Banden von Proteinen mit der molekularen Masse von 33 bzw. 36 kDa. und kamen bezüglich ihrer Größe als Kandidaten für die MtbA von *M. mazei* (theoret. mol. Masse: 36,6 kDa) in Betracht.

Zur genaueren Analyse der Funktion der MtbA bei der Bismut-Methylierung wurde das in *E. coli* heterolog exprimierte Enzym herangezogen.

#### 4.2.3 Kinetik der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion: Hinweis auf die enzymatische Bildung eines essenziellen Intermediates

Generell ist der Zeitverlauf der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion gekennzeichnet durch eine Lag-Phase, die – je nach Reaktionsbedingungen – bis zum Erreichen der maximalen Aktivität ( $V_{\text{maxTest}}$ ) über 300 sec dauern kann. Die Vermutung, dass in dieser Zeit enzymatische Reaktionen ablaufen, die für die Bildung des Endprodukts  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  essenziell sind, wird durch die Beobachtung gestützt, dass ‚verspätete‘ Zugaben von Bi-Ammoniumcitrat zur Reaktionsmischung keinen Einfluss auf die Lag-Phase haben (3.8). Einen deutlichen Hinweis darauf, um welche Reaktion es sich hier handeln könnte und welche Verbindung essenzielle Bedeutung für die Methylierung von Bismut haben könnte, lieferten spektralfotometrische Untersuchungen der nativen Reaktion der MtbA (Methyltransfer von MeCob auf CoM), die die Bildung von Cob(I) bei gleichzeitiger Abnahme von MeCob in der ersten Phase der CoM-Methylierung durch die MtbA erkennen ließen. Diese Reaktion wies in Gegenwart der Präp. I der MtbA eine Lag-Phase

(bei Demethylierung von MeCob und Entstehung von Cob(I)) auf, ebenso wie die Bismut-Methylierung durch Präp. I. Das unterstützt zusätzlich die Vermutung der Kopplung der Bismut-Methylierung an die Entstehung von Cob(I).

Außerdem wurde in Gegenwart von Bi-Ammoniumcitrat in diesem Assay kein Cob(I) gefunden (siehe 3.6). Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass das gebildete Cob(I) sofort für die Bismut-Methylierung verbraucht wird. Der angenommene Reaktionsmechanismus der biotischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion ist in Abb. 52 dargestellt, und in Abb. 53 und Abb. 54 sind die entsprechenden Reaktionsgleichungen wiedergegeben. Die Bedeutung von Cob(I) für die abiotische  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung wurde unter 3.2.3 belegt. Über die rein chemische Folgereaktion zur Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  kann derzeit nur spekuliert werden. Denkbar wäre, dass das während der CoM-Methylierung gebildete Cob(I) als starkes Reduktionsmittel die Abtrennung des Methyl-C-Atoms von MeCob als Anion ermöglicht, um so die Methylgruppe für einen Transfer auf  $\text{Bi}^{\text{III}}$  zu befähigen. Eine radikalische Übertragung der Methylgruppe kann bei der biotischen Reaktion ebenso wie bei der schon oben beschriebenen abiotischen Methylierung in Gegenwart von Cob(I) ausgeschlossen werden, da bei der biotischen Bismut-Methylierung die Zugabe von tert. Butanol zum Reaktionsansatz keinen Effekt hat.

Die in dieser Arbeit charakterisierte MtbA von *M. mazei* stellt *in vitro* durch Transmethylierung von MeCob auf CoM Cob(I) her, das als Reduktionsmittel die Bismut-Methylierung ermöglichen kann. Somit ist die Bildung von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  ein chemischer Prozess, der jedoch durch einen Enzym-abhängigen Prozess ermöglicht wird.

*In vivo* dient eigentlich ein Enzym-gebundenes Corrinoid in der MtbC als Methylcarrier, dessen Cobalt-Atom sowohl in Oxidationsstufe I und III vorliegen kann. Es ist nicht bekannt, ob die MtbA von *M. mazei* *in vivo* auch freies MeCob nutzen kann. Es kann vermutet werden, dass auch Enzym-gebundenes  $\text{Co}^{\text{I}}$  als Reduktionsmittel fungieren kann.

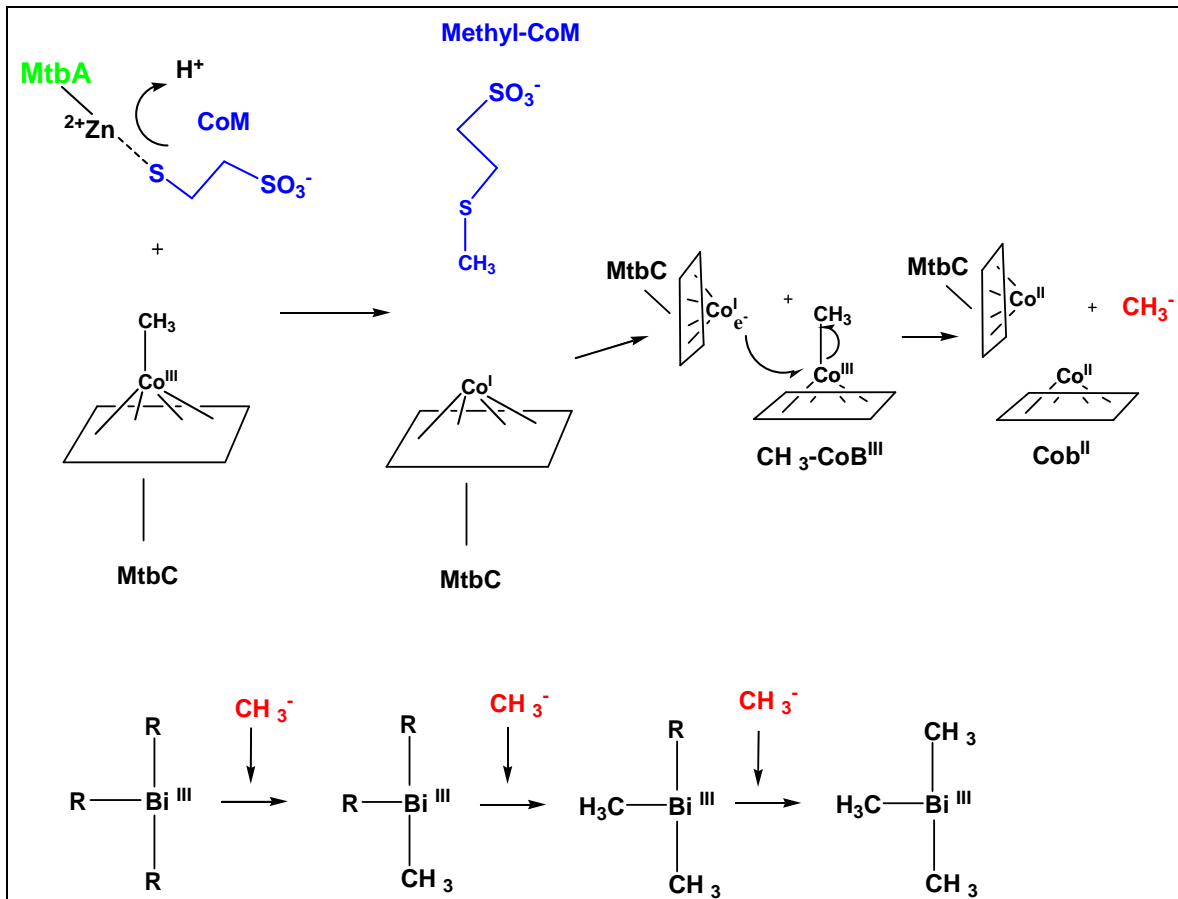


Abb. 53 Hypothetisches Reaktionsschema der (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Bildung im Anschluss an die Enzym-katalysierte Methylierung von CoM und Entstehung von Cob(I).

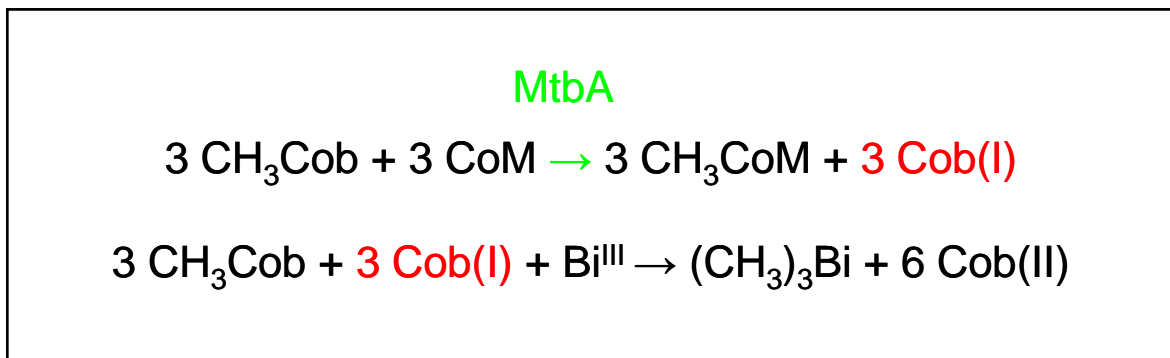


Abb. 54 Hypothetische Reaktionsgleichung der (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Bildung im Anschluss an die Enzym-katalysierte Methylierung von CoM und Entstehung von Cob(I).

Da die MtbA ein hochkonserviertes Enzym mit zahlreichen Homologen innerhalb der *Methanosarcinales* ist, kann man davon ausgehen, dass die nachgewiesene (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion durch *M. barkeri* (Meyer *et al.* 2008) ebenfalls durch ein Enzym dieser Familie katalysiert wird. Allerdings konnte auch für andere Vertreter methanogener Archaea die MeCob-abhängige (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion *in vitro* nachgewiesen werden, z. B. für *Methanobacterium formicicum* (Michalke *et al.* 2002a). Dieser Organismus verfügt nicht über Homologe der MtbA, da er weder Methylamine noch Methanol als Methylendonoren

nutzen kann. Allerdings besitzt dieser Organismus an anderer Stelle im Stoffwechsel eine Corrinoid-abhängige Methyltransferase und zwar das Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein CFeSP (Madigan *et al.* 2001; Ragsdale *et al.* 2008) des reduktiven Acetyl-CoA-Weges, das Methylgruppen vom N<sub>5</sub>-Methyltetrahydromethanopterin auf den Acetyl-CoA-Synthese-Komplex überträgt. Auch bei dieser Transmethylierung liegt das Cobalt-Atom des Enzym-gebundenen Corrinoids als Co<sup>I</sup> vor und kann so möglicherweise als Reduktionsmittel fungieren. Es ist nicht bekannt, ob das Enzym auch freies MeCob als Methyl donor nutzen kann.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es weitere Methyltransferasen, die den Methyltransfer auf Thiole katalysieren, allerdings nur eine Corrinoid-abhängige: die Cobalamin-abhängige Methionin-Synthase MetH (Peariso *et al.* 1998) *E. coli*, die den Methyltransfer von Methyltetrahydrofolat auf Homocystein katalysiert, wobei Methionin entsteht. Das Cobalt-Atom liegt auch hier als Co<sup>I</sup> vor, sodass möglicherweise (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi gebildet werden kann. Für die Bildung von Methyl-Quecksilber wird von mehreren Autoren eine Beteiligung der Methionin-Synthase MetH angenommen (Lander 1971; Regnell 1995; Siciliano *et al.* 2002). Möglicherweise beruht der Methylierungsmechanismus in diesem Fall auf demselben Reaktionsprinzip.

Eine andere interessante Corrinoid-abhängige Methyltransferase, die durch Erzeugung von Cob(I) die Bismut-Methylierung fördern könnte, ist die O-Demethylase von *Moorella thermoacetica* (Berman *et al.* 1992; Elkasmi *et al.* 1994; Messmer *et al.* 1996; Kaufmann *et al.* 1997), die die Methylgruppe aber statt auf ein Thiol auf Tetrahydrofolat überträgt, auch in diesem Fall ist das Co<sup>I</sup>-Atom der intermediäre Methylgruppenakzeptor.

#### 4.2.4 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktion versus CoM-Methylierung: Abhängigkeit und Konkurrenz

Der bifaziale Charakter der (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Bildung – als teils enzymatische, teils rein chemische Reaktion – spiegelt sich auch in den Kinetiken der Bismut-Methylierungsraten wider, wie sie sich aus den „Online“-Messungen ableiten lassen.

Die Kinetiken der Bismut-Methylierungsraten lassen sich in Abhängigkeit des Aktivitätszustandes der MtbA und der jeweiligen Reaktionsbedingungen zwei charakteristischen Typen zuordnen:

**Typ 1** ist charakterisiert durch eine kurze Lag-Phase bis zum Erreichen der maximalen Umsatzrate (in der Regel: 35 bis 50 sec.) und durch eine relativ niedrige maximale Aktivität ( $V_{\max\text{Test}}$ : 0,1 bis 1 nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>).

**Typ 2** ist gekennzeichnet durch eine lange Lag-Phase (200 bis 500 sec) und eine relativ hohe maximale Aktivität ( $V_{\max\text{Test}}$ : 4 bis 50 nmol mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>).

Auffälligerweise wurde Typ 1 bei Enzympräparationen angetroffen, die als nativ gelten, da sie frisch präpariert oder unter Bedingungen vor oder während der Aktivitätsbestimmungen schonend inkubiert wurden. ‚Schonend‘ bedeutet in erster Linie, dass sie unter reduzierenden Bedingungen (in Gegenwart von DTT, GSH, CoM oder TCEP) und / oder bei höheren (> 1 µg ml<sup>-1</sup>) Enzymkonzentrationen bearbeitet und gemessen wurden (siehe 3.7.3 und 3.5).

Typ 2 war dagegen fast ausnahmslos dann festzustellen, wenn eine entsprechende Vorbehandlung des Enzyms oder die jeweiligen Reaktionsbedingungen eine Beeinträchtigung der enzymatischen CoM-Methylierung erwarten ließen, wie zum Beispiel konformelle Schädigungen des Proteins infolge des Einfrierens bei -20 °C oder infolge von Oxidationsreaktionen, hervorgerufen durch Oxidationsmittel wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und (CoM)<sub>2</sub>. Außerdem bewirken Enzymkonzentrationen ≤ 1 µg ml<sup>-1</sup> in den Ansätzen eine Verlängerung der Lag-Phase bei gleichzeitiger Steigerung von  $V_{\max\text{Test}}$ . Interessanterweise waren diese Effekte größtenteils durch Reduktionsmittel revertierbar, wie die entsprechenden Bi-Methylierungsanalysen zeigten (siehe 3.5 und 3.7.3.3). Vermutlich ist ein Teil der konformellen Schäden auf reversible oxidative Schädigungen des Enzyms zurückzuführen.

Diese verschiedenen Methylierungskinetiken lassen sich wahrscheinlich auf Unterschiede in der Aktivität der enzymatischen ‚Vorreaktion‘ (Methyltransfer von MeCob auf CoM mit Entstehung von Cob(I)) zurückführen.

So lässt sich die kurze Lag-Phase der Typ 1-Kinetik dadurch erklären, dass eine hoch aktive MtbA sehr schnell Cob(I) generiert, und damit die Basis für einen entsprechend frühen Start der chemischen Weiterreaktion zu (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi stellt. Für die relativ geringen  $V_{\max\text{Test}}$ -Werte der Typ 1-Kinetik scheinen ebenfalls enzymatische Effekte verantwortlich zu sein. So ist denkbar, dass die geringen max. (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Produktionsraten dieses Typs die Folge einer Konkurrenz der Methylakzeptoren CoM und Bi<sup>III</sup> um MeCob ist, die bei einer hochaktiven MtbA zu Gunsten der CoM-Methylierung ausfällt, sodass für die chemische Bismut-Methylierung nur noch wenig MeCob zur Verfügung steht.

Im Gegensatz dazu kann die Typ 2-Kinetik damit erklärt werden, dass in diesen Fällen eine eher nur suboptimal arbeitende MtbA längere Zeit braucht um für die nötige Cob(I)-Konzentration zu sorgen, die die chemische Produktion einer nachweisbaren (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Bi-Menge zulässt. Die überraschend hohen Maximal-Geschwindigkeiten der Bismut-Methylierung dieses Typs lassen sich damit erklären, dass das entsprechend geschädigte

Enzym bei der Konkurrenz um MeCob als Methyl donor für die CoM-Methylierung weniger effizient ist und die Bismut-Methylierung bevorzugt abläuft.

#### 4.2.5 Einfluss von Bi-Ammoniumcitrat auf die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion und die Methylierung von CoM

Für die Beantwortung der Frage nach den Hintergründen des generell hohen Potenzials der Methanoarchaea, Metalle und Metalloide zu volatilisieren und für die Beantwortung der speziellen Frage nach der physiologischen Bedeutung der Bi-Methylierung zu flüchtigem  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  (als gezielter Entgiftungsmechanismus gegenüber zu hoher Bismut-Belastung des Organismus oder als Folge von Unspezifitäten bestimmter Enzyme des Stoffwechsels) ist sicher die Kenntnis des Mechanismus der Biomethylierung von Metalloiden eine wichtige Voraussetzung. Nach den vorliegenden Untersuchungen an *M. mazei* müssen lediglich zwei Voraussetzungen gegeben sein, um die Biomethylierung von Metall(oid)en zu gewährleisten:

- 1) Vorliegen eines potenten Methyl donors (z. B. MeCob) und
- 2) ein ausreichend niedriges Redoxpotenzial, gewährleistet durch entsprechende Konzentrationen von Cob(I) oder möglicherweise auch von anderen reduzierenden Intermediaten oder Co-Faktoren.

Die eigentlich relevante Reaktion stellt eine nicht-enzymatische, rein chemische Reaktion dar. Dennoch spielt die enzymatische ‚Vorreaktion‘ der MtbA als Produzent von Cob (I) eine wichtige Rolle bei der Synthese von  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ . Aufschlussreich für die Beantwortung der Frage nach der physiologischen Bedeutung der Reaktion ist der Befund, dass die MtbA erstaunlich empfindlich gegenüber Bi-Ammoniumcitrat reagiert: Wie die Ergebnisse der UV/VIS-spektrofotometrischen Messungen zeigen, bewirkt eine Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Bi-Ammoniumcitrat während der Methyltransferreaktion von MeCob auf CoM durch die MtbA einen sofortigen Stop der Demethylierungsreaktion des MeCob. Die Gründe für diese Hemmung können verschieden sein: Oxidation von Thiolgruppen, konformelle Störungen etc. Unter der Annahme einer spezifischen Abwehr gegen Bismut wäre diese deutliche Hemmung allerdings nicht zu verstehen; die Daten sprechen eher dafür, dass die Bi-Methylierung der MtbA eine unspezifische Nebenreaktion darstellt.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Es war das Ziel dieser Arbeit, Einblicke in die molekularen Mechanismen der Bismut-Methylierung zu erhalten. Das Verständnis dieser Prozesse kann dazu beitragen, das ökologische Risiko der Freisetzung des toxischen flüchtigen Derivats  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  abzuschätzen.

Im Blut von Bismut-gefütterten Mäusen mit intakter Darmmikrobiota konnten signifikante Mengen flüchtiges  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  nachgewiesen werden, dessen Produktion der intestinalen Darmmikrobiota zugeschrieben werden kann. Diese Verbindung scheint in direktem Zusammenhang mit deutlich erhöhten Mengen anorganischen Bismuts in den Organen zu stehen, da in den Organen der keimfreien, Bismut-gefütterten Mäuse, in deren Blut kein  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$  nachweisbar war, deutlich weniger Bismut abgelagert war.

Als nächstes soll sich eine weitere Maus-Studie anschließen, wobei der Fokus auf der Detektion und Identifizierung teilmethylierter Bismutderivate im Blut liegen wird, um zu überprüfen, ob es eine Korrelation zwischen deren Konzentration und der Menge anorganischen Bismuts in den Organen gibt. Studien am Maus-Modell sollen Einblick in die Fragestellung geben, ob eventuell Geschlecht, Alter, Ernährung und Medikamenteneinsatz Einfluss auf die Bismutderivatisierung haben, da diese Faktoren die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota gravierend beeinflussen.

Mittels *in vitro*-Bismut-Methylierungs-Assays konnten die biotischen und abiotischen Voraussetzungen für die Genese von flüchtigen Bismutderivaten bestimmt werden. Entscheidend für die Übertragung von Methylgruppen auf Bismut ist die Anwesenheit eines starken Reduktionsmittels (z. B. Cob(I) oder TiCIt), das die Abspaltung der Methylgruppe von MeCob als Carbanion vermittelt und so die Übertragung auf  $\text{Bi}^{\text{III}}$  ermöglicht. Die MtbA von *M. mazei* erzeugt *in vitro* Cob(I) während der Übertragung von Methylgruppen von MeCob auf CoM. Nach jetzigem Kenntnisstand ist MeCob der einzig mögliche biotische Methyl donor, da speziell dieser Kofaktor anders als SAM und MTHF, in der Lage ist, ein Carbanion abzugeben (Ridley *et al.* 1977). *In vivo* fungiert vermutlich Enzym-gebundenes Corrinoid als Methylgruppenüberträger (gebunden an die MtbC der Methanogenese in *M. mazei*), es ist aber nicht auszuschließen, dass *in vivo* auch freies MeCob genutzt wird. In nächster Zukunft soll untersucht werden, ob homologe Enzyme der MtbA (z. B. MtaA, Methionin-Synthetase von *E. coli*) in der Lage sind, die Methylierung von Bismut (durch Bildung von Cob(I)) zu vermitteln und die Möglichkeit der Methylierung weiterer Metal(oid)e im biotischen *in vitro*-Assay in Gegenwart der MtbA getestet werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Allen, J. R., D. D. Clark, J. G. Krum and S. A. Ensign** (1999). A role for coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid) in a bacterial pathway of aliphatic epoxide carboxylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(15): 8432-8437.
- Altschul, S., T. Madden, A. Schaffer, J. H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. Lipman** (1998). Gapped blast and psi-blast: A new generation of protein database search programs. *Faseb Journal* 12(8): 102.
- Amouroux, D., C. Pecheyran and O. F. X. Donard** (2000). Formation of volatile selenium species in synthetic seawater under light and dark experimental conditions. *Applied Organometallic Chemistry* 14(5): 236-244.
- Andrewes, P., K. T. Kitchin and K. Wallace** (2004). Plasmid DNA damage caused by stibine and trimethylstibine. *Toxicology And Applied Pharmacology* 194(1): 41-48.
- Aslund, F., K. D. Berndt and A. Holmgren** (1997). Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *Journal of Biological Chemistry* 272(49): 30780-30786.
- Bakir, F., S. F. Damluji, L. Aminzaki, M. Murtadha, A. Khalidi, N. Y. Alrawi, S. Tikriti, H. I. Dhahir, T. W. Clarkson, J. C. Smith and R. A. Doherty** (1973). Methylmercury poisoning in Iraq - interuniversity report. *Science* 181(4096): 230-241.
- Banerjee, R. and S. W. Ragsdale** (2003). The many faces of vitamin B<sub>12</sub>: Catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 72: 209-247.
- Barker, H. A.** (1936). Studies upon the methane-producing bacteria. *Archives of Microbiology*. 7: 420-438.
- Bartosch, S., A. Fite, G. T. Macfarlane and M. E. T. McMurdo** (2004). Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6): 3575-3581.
- Bentley, R. and T. G. Chasteen.** (2002). Microbial methylation of metal(loid)s: Arsenic, antimony and bismuth. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 250-271.
- Berman, M. H. and A. C. Frazer** (1992). Importance of tetrahydrofolate and ATP in the anaerobic O-demethylation reaction for phenylmethylethers. *Applied and Environmental Microbiology* 58(3): 925-931.
- Boening, D. W.** (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: A general review. *Chemosphere*. 40: 1335-1351.
- Boertz, J., L. M. Hartmann, M. Sulkowski, J. Hippler, F. Mosel, R. A. Diaz-Bone, K. Michalke, A. W. Rettenmeier and A. V. Hirner** (2009). Determination of trimethylbismuth in the human body after ingestion of colloidal bismuth subcitrate. *Drug Metabolism and Disposition* 37(2): 352-358.
- Boone, D. R., W. B. Whitman, P. E. Rouviere** (1993). Diversity and taxonomy of methanogens. In *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry and genetics*. (J. G. Ferry, ed.), p. 35. Chapman & Hall, New York / London.



- Bradford, M. M.** (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Breksa, A. P. and T. A. Garrow** (1999). Recombinant human liver betaine-homocysteine S-methyltransferase: Identification of three cysteine residues critical for zinc binding. *Biochemistry* 38(42): 13991-13998.
- Buck S. S., E. E. Hansen, J. K. Manchester, P. M. Coutinho, B. Henrissat, R. Fulton, K. Kim, P. Latreille, R. K. Wilson, and J. I. Gordon,** (2007). Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(25): 10643-10648.
- Buge, A., G. Rancurel, M. Poisson and H. Dechy** (1974). Myoclonic encephalopathies in patients for long-time orally taking bismuth sub-nitrate - 6 cases observed during long-term oral treatments. *Nouvelle Presse Medicale* 3(36): 2315-2320.
- Burke, S. A. and J. A. Krzycki** (1995). Involvement of the  $\alpha$ -isozyme of methyltransferase-II and the 29-kilodalton corrinoid protein in methanogenesis from monomethylamine. *Journal of Bacteriology* 177(15): 4410-4416.
- Burke, S. A. and J. A. Krzycki** (1997). Reconstitution of monomethylamine:coenzyme M methyl transfer with a corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Biological Chemistry* 272(26): 16570-16577.
- Burke, S. A., S. L. Lo and J. A. Krzycki** (1998). Clustered genes encoding the methyltransferases of methanogenesis from monomethylamine. *Journal of Bacteriology* 180(13): 3432-3440.
- Burns, R., D. W. Thomas and V. J. Barron** (1974). Reversible encephalopathy possibly associated with bismuth subgallate ingestion. *British Medical Journal* 1(5901): 220-223.
- Celo, V., D. R. S. Lean and S. L. Scott** (2006). Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Science of the total Environment* 368(1): 126-137.
- Challenger, F.** (1945). Biological methylation. *Chemical Reviews*. 36: 315-318.
- Challenger, F., C. Higginbottom, L. Ellis** (1933). The formation of organo-metalloidal compounds by microorganisms. *Journal of the Chemical Society* 5: 95-101.
- Chen, B. W., G. B. Jiang, R. Q. Yang and J. Y. Liu** (2006). Methylation of tin(II) by methyl iodide: Influences of different environmental factors on the efficiency and reaction kinetics. *Applied Organometallic Chemistry* 20(3): 161-167.
- Chen, B. W., Q. F. Zhou, J. Y. Liu, D. D. Cao, T. Wang and G. B. Jiang** (2007). Methylation mechanism of tin(II) by methylcobalamin in aquatic systems. *Chemosphere* 68(3): 414-419.
- Choi, S. C., T. Chase and R. Bartha** (1994). Enzymatic catalysis of mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Applied and Environmental Microbiology* 60(4): 1342-1346.
- Cleland, W. W.** (1964). Dithiothreitol new protective reagent for SH-groups. *Biochemistry* 3(4): 480-8.
- Craig, P. J.** (1986). Organometallic compounds in the environment: Principles and reactions. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Craig, P. J.** (2003). Organometallic compounds in the environment. John Wiley & Sons, Chichester.

- Dopp, E., L. M. Hartmann, A. M. Florea, A. W. Rettenmeier and A. V. Hirner** (2004). Environmental distribution, analysis, and toxicity of organometal(loid) compounds. *Critical Reviews Toxicology* 34(3): 301-33.
- Dryhurst, G., K. M. Kadish, F. Scheller and R. Renneberg**, (1982). Vitamin B<sub>12</sub> and related compounds. *Biological electrochemistry*, vol. 1. Academic Press, New York.: 313 - 397.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson and D. A. Relman** (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308(5728): 1635-1638.
- Ehrenstein, C., P. Shu, E. B. Wickenheiser, A. V. Hirner, M. Dolfen, H. Emons, G. Obe** (2002). Methyl mercury uptake and associations with the induction of chromosomal aberrations in chinese hamster ovary (CHO) cells. *Chemico-Biological Interactions*. 141: 259-274.
- Elkasmí, A., S. Rajasekharan and S. W. Ragsdale** (1994). Anaerobic pathway for conversion of the methyl-group of aromatic methyl ethers to acetic-acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry* 33(37): 11217-11224.
- Fahlbusch, K., H. Hippe and G. Gottschalk** (1983). Formation of ethylamine and methane from dimethylethylamine by *Methanosarcina barkeri*. *Fems Microbiology Letters* 19(1): 103-104.
- Feldmann, J.** (1997). Summary of a calibration method for the determination of volatile metal(loid) compounds in environmental gas samples by using gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12(9): 1069-1076.
- Feldmann, J., R. Grumping and A. V. Hirner** (1994). Determination of volatile metal and metalloid compounds in gases from domestic waste deposits with GC/ICP-MS. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 350(4-5): 228-234.
- Feldmann, J. and A. V. Hirner** (1995). Occurrence of volatile metal and metalloid species in landfill and sewage gases. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 60(2-4): 339-359.
- Fender, H. and G. Wolf** (1998). Cytogenetic investigations in employees from waste disposal sites. *Toxicology. Letters*. 96-97: 149-154.
- Ferguson, D. J., N. Gorlatova, D. A. Grahame and J. A. Krzycki** (2000). Reconstitution of dimethylamine:coenzyme M methyl transfer with a discrete corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Biological Chemistry* 275(37): 29053-29060.
- Ferguson, D. J., J. A. Krzycki and D. A. Grahame** (1996). Specific roles of Methylcobamide:coenzyme M methyltransferase isozymes in metabolism of methanol and methylamines in *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Biological Chemistry* 271(9): 5189-5194.
- Fergusson, J. F.** (1991). *The heavy metals: Chemistry, environmental impact and health effects*. Pergamon Press, Oxford.
- Fickling, M.** (1999). Review of bismuth in 1998. *Bull. Bismuth Inst.* 74: 3-4.
- Finster, K., Y. Tanimoto and F. Bak** (1992). Fermentation of methanethiol and dimethylsulfide by a newly isolated methanogenic bacterium. *Archives of Microbiology* 157(5): 425-430.

- Gadd, G. M.** (1993). Microbial formation of organometallic and organometalloid compounds. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews 11: 297-316.
- Gosio, B.** (1897). Zur Frage, wodurch die Giftigkeit arsenhaltiger Tapeten bedingt wird. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 30: 1024-1026.
- Grahame, D. A.** (1989). Different isozymes of methylcobalamin-2-mercaptoethanesulfonate methyltransferase predominate in methanol-grown versus acetate-grown *Methanosarcina barkeri*. Journal of Biological Chemistry 264(22): 12890-12894.
- Gunsalus, R. P., J. A. Romesser and R. S. Wolfe** (1978). Preparation of coenzyme M analogs and their activity in methyl coenzyme M reductase system of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Biochemistry 17(12): 2374-2377.
- Hanahan, D. and M. Meselson** (1983). Plasmid screening at high colony density. Methods in Enzymology 100: 333-342.
- Harms, U. and R. K. Thauer** (1996). Methylcobalamin-coenzyme M methyltransferase isoenzymes MtaA and MtbA from *Methanosarcina barkeri* - cloning, sequencing and differential transcription of the encoding genes, and functional overexpression of the MtaA gene in *Escherichia coli*. European Journal of Biochemistry 235(3): 653-659.
- Hathaway, G. J., N. H. Proctor, J. P. Hughes and M. L. Fischman** (1991). Proctor and Hughes' chemical hazards of the workplace, 3rd Ed. Van Nostrand Reinhold, New York, NY.
- Hayashi, H., M. Sakamoto and Y. Benno** (2002). Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. Microbiology and Immunology 46(12): 819-831.
- Hespe, W., H. J. Staal and D. W. Hall** (1988). Bismuth absorption from the colloidal subcitrate. Lancet 2(8622): 1258.
- Hippe, H., D. Caspari, K. Fiebig and G. Gottschalk** (1979). Utilization of trimethylamine and other n-methyl compounds for growth and methane formation by *Methanosarcina barkeri*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76(1): 494-498.
- Hirner, A. V., J. Feldmann, E. Krupp, R. Grumping, R. Goguel and W. R. Cullen** (1998). Metal(l)organic compounds in geothermal gases and waters. Organic Geochemistry 29(5-7): 1765-1778.
- Hogenkamp, H. P. C.** (1966). Photolysis of methylcobalamin. Biochemistry 5(2): 417-422.
- Hogenkamp, H. P. C., G. T. Bratt and S. Sun** (1985). Methyl transfer from methylcobalamin to thiols - a reinvestigation. Biochemistry 24(23): 6428-6432.
- Hold, G. L., S. E. Pryde, V. J. Russell, E. Furrie and H. J. Flint** (2002). Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16s rDNA sequence analysis. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology 39(1): 33-39.
- Hooper, L. V., J. Xu, P. G. Falk, T. Midtvedt and J. I. Gordon** (1999). A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(17): 9833-9838.

- Hovey, R., S. Lenters, A. Ehrenreich, K. Salmon, K. Saba, G. Gottschalk, R. P. Gunsalus and U. Deppenmeier (2005). DNA microarray analysis of *Methanosarcina mazei* Gö1 reveals adaptation to different methanogenic substrates. *Molecular Genetics and Genomics* 273(3): 225-239.
- Jie Qin, B. P. R., Y. Zhang, G. Wang, S. Franke and C. Rensing (2005). Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 2075-2080.
- John, J. P. P., J. E. Oh, A. Pollak and G. Lubec (2008). Identification and characterisation of arsenite (3<sup>+</sup> oxidation state) methyltransferase (AS3MT) in mouse neuroblastoma cell line N1E-115. *Amino Acids* 35(2): 355-358.
- Kaufmann, F., G. Wohlfarth and G. Diekert (1997). Isolation of O-demethylase, an ether-cleaving enzyme system of the homoacetogenic strain MC. *Archives of Microbiology* 168(2): 136-142.
- Klimecki, W. T. and D. E. Carter (1995). Arsine toxicity - chemical and mechanistic implications. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 46(4): 399-409.
- Kreft, J. U. and B. Schink (1994). O-demethylation by the homoacetogenic anaerobe *Holophaga foetida* studied by a new photometric methylation assay using electrochemically produced cob(I)alamin. *European Journal of Biochemistry* 226(3): 945-951.
- Kruer, M., M. Haumann, W. Meyer-Klaucke, R. K. Thauer and H. Dau (2002). The role of zinc in the methylation of the coenzyme M thiol group in methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri* - new insights from X-ray absorption spectroscopy. *European Journal of Biochemistry* 269(8): 2117-2123.
- Laden, B. P. and T. D. Porter (2001). Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: Evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *Journal Of Lipid Research* 42(2): 235-240.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lander, L. (1971). Biochemical model for the biological methylation of mercury suggested from methylation studies *in vivo* with *Neurospora crassa*. *Nature* 230: 452-454.
- LeClerc, G. M. and D. A. Grahame (1996). Methylcobamide:coenzyme M methyltransferase isozymes from *Methanosarcina barkeri* - physicochemical characterization, cloning, sequence analysis, and heterologous gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 271(31): 18725-18731.
- Leonard, A., and R. R. Lauwery (1980). Carcinogenicity, tetragenicity and mutagenicity of arsenic. *Mutation Research* 75(49-62).
- Lexa, D. and J. M. Saveant (1983). The electrochemistry of vitamin B<sub>12</sub>. *Accounts of Chemical Research* 16(7): 235-243.
- Lexa, D., J. M. Saveant and J. Zickler (1977). Electrochemistry of vitamin-B<sub>12</sub>. 2. Redox and acid-base equilibria in B<sub>12a</sub>/B<sub>12r</sub> system. *Journal of the American Chemical Society* 99(8): 2786-2790.
- Ley, R. E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight and J. I. Gordon (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(31): 11070-11075.
- Luke, G. T. and M. D. Tedeshi. (1982). The minamata disease. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 3(335-338).

- Luppino, M. A. and A. J. McLean** (1995). Plasma and tissue distribution of bismuth in normal and cirrhotic rats. *Analyst* 120(3): 883-886.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko and J. Parker** (2001). *Brock Mikrobiologie*. Spektrum, Akademischer Verlag, Berlin.
- Maeder, D. L., I. Anderson, T. S. Brettin, D. C. Bruce, P. Gilna, C. S. Han, A. Lapidus, W. W. Metcalf, E. Saunders, R. Tapia and K. R. Sowers** (2006). The *Methanosarcina barkeri* genome: Comparative analysis with *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei* reveals extensive rearrangement within methanosarcinal genomes. *Journal of Bacteriology* 188(22): 7922-7931.
- Mah, R. A. and D. A. Kuhn** (1984). Transfer of the type species of the genus *Methanococcus* to the genus *Methanosarcina*, naming it *Methanosarcina mazei* (Barker 1936) comb nov et emend and conservation of the genus *Methanococcus* (approved lists 1980) with *Methanococcus vannielii* (approved lists 1980) as the type species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34(2): 263-265.
- Malinovskiy, D., F. Vanhaecke and L. Moens** (2009). Isotopic fractionation of Sn due to methylation and demethylation reactions in aqueous solution. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73(13): A822-A822.
- Matthews, R. G. and C. W. Goulding** (1997). Enzyme-catalyzed methyl transfers to thiols: The role of zinc. *Current Opinion in Chemical Biology* 1(3): 332-339.
- Mayer, H. P. and S. Rapsomanikis** (1992). Chemical methylation of germanium(II) in model aqueous-solutions. *Applied Organometallic Chemistry* 6(2): 173-178.
- McBride, B. C. and R. S. Wolfe** (1971). Biosynthesis of dimethylarsine by *Methanobacterium*. *Biochemistry* 10(23): 4312-4317.
- McCarthy, C.** (1996). Chromas. <http://www.mb.mahidol.ac.th/pub/chromas/chromas.htm>.
- Messmer, M., S. Reinhardt, G. Wohlfarth and G. Diekert** (1996). Studies on methyl chloride dehalogenase and O-demethylase in cell extracts of the homoacetogen strain MC based on a newly developed coupled enzyme assay. *Archives Of Microbiology* 165(1): 18-25.
- Meyer, J.** (2007). Biotransformation von Metall(oid)en zu flüchtigen Derivaten durch mikrobielle Biozönosen und Reinkulturen von anaeroben Prokaryonten. Inaugural-Dissertation. Fachbereich Biologie und Geografie der Universität Duisburg-Essen. Standort: Essen.
- Meyer, J., K. Michalke, T. Kouril and R. Hensel** (2008). Volatilisation of metals and metalloids: An inherent feature of methanoarchaea? *Systematic and Applied Microbiology* 31(2): 81-87.
- Meyer, J., A. Schmidt, K. Michalke and R. Hensel** (2007). Volatilisation of metals and metalloids by the microbial population of an alluvial soil. *Systematic and Applied Microbiology* 30(3): 229-238.
- Michalke, K.** (1999). Biogenese flüchtiger Metall(oid)-Verbindungen. Inaugural-Dissertation. Fachbereich Geographie und Biologie der Universität Duisburg-Essen, Standort: Essen.
- Michalke, K., J. Meyer, A. V. Hirner and R. Hensel** (2002). Biomethylation of bismuth by the methanogen *Methanobacterium formicicum*. *Applied Organometallic Chemistry* 16: 221-227.

- Michalke, K., J. Meyer, and R. Hensel** (2007). Methylation of metal(loid)s by methanoarchaea: Production of volatile derivatives with high ecotoxicological impact and health concern. In: R. Garrett and H. P. Klenk (ed.), *Archaea-physiology, molecular biology and evolution*. Blackwell, Oxford, United Kingdom. .
- Michalke, K., A. Schmidt, B. Huber, J. Meyer, M. Sulkowski, A. V. Hirner, J. Boertz, F. Mosel, P. Dammann, G. Hilken, H. J. Hedrich, M. Dorsch, A. W. Rettenmeier and R. Hensel** (2008). Role of intestinal microbiota in transformation of bismuth and other metals and metalloids into volatile methyl and hydride derivatives in humans and mice. *Applied and Environmental Microbiology* 74(10): 3069-3075.
- Michalke, K., E. B. Wickenheiser, M. Mehring, A. V. Hirner and R. Hensel** (2000). Production of volatile derivatives of metal(loid)s by microflora involved in anaerobic digestion of sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 66(7): 2791-2796.
- Michalke, K. and R. Hensel** (2004). Microbial biotransformations of metal(loid)s. In A. V. Hirner and H. Emons (ed.), *Organic metal and metalloid species in the environment: analysis, distribution, processes and toxicological evaluation*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany: 285-293.
- Miller, T. L. and M. J. Wolin** (1985). *Methanosphaera stadtmaniae* gen-nov, sp-nov - a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Archives Of Microbiology* 141(2): 116-122.
- Miller, T. L., M. J. Wolin, E. C. Demacario and A. J. L. Macario** (1982). Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 43(1): 227-232.
- Mueller, S., K. Saunier, C. Hanisch, E. Norin, L. Alm, T. Midtvedt, A. Cresci, S. Silvi, C. Orpianesi, M. C. Verdenelli, T. Clavel, C. Koebnick, H. J. F. Zunft, J. Dore and M. Blaut** (2006). Differences in fecal microbiota in different european study populations in relation to age, gender, and country: A cross-sectional study. *Applied and Environmental Microbiology* 72(2): 1027-1033.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* - the polymerase chain-reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273.
- Nakamura, K., H. Yoshio, P. Ling and H. Yamauchi** (2009). Methyl transfer from a hydrophobic vitamin B<sub>12</sub> derivative to arsenic trioxide. *Journal of Organometallic Chemistry* 694(6): 916-921.
- Newton, D., R. J. Talbot and N. D. Priest** (2001). Human biokinetics of injected bismuth-207. *Human & Experimental Toxicology* 20(12): 601-609.
- Noach, L. A., J. L. A. Eekhof, L. J. Bour, F. E. P. Meyjes, G. N. J. Tytgat and B. W. O. Devisser** (1995). Bismuth salts and neurotoxicity - a randomized, single-blind and controlled-study. *Human & Experimental Toxicology* 14(4): 349-355.
- Peariso, K., C. W. Goulding, S. Huang, R. G. Matthews and J. E. Penner-Hahn** (1998). Characterization of the zinc binding site in methionine synthase enzymes of *Escherichia coli*: The role of zinc in the methylation of homocysteine. *Journal of the American Chemical Society* 120(33): 8410-8416.
- Per G. Falk, L. V. H., Tore Midtvedt and Jeffrey I. Gordon** (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(4): 1157-1170.

- Pergantis, S. A., M. Miguens-Rodriguez, N. P. Vela and D. T. Heitkemper** (2004). Investigating the non-enzymatic methylation of arsenite by methylcobalamin B<sub>12</sub> using high-performance liquid chromatography on-line with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19(1): 178-182.
- Pratt, J. M. and B. R. D. Whitear** (1971). Photolysis of methylcobalamin. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic Physical Theoretical*(2): 252-255.
- Ragsdale, S. W. and E. Pierce** (2008). Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1784(12): 1873-1898.
- Regnell, O.** (1995). Methylmercury in lakes: Factors affecting its production and partitioning between water and sediment. Phd thesis. Lund university, Lund, Sweden.
- Ridley, W. P., L. J. Dizikes and J. M. Wood** (1977). Biomethylation of toxic elements in the environment. *Science* 197(4301): 329-332.
- Rieu-Lesme, F., C. Delbes and L. Sollelis** (2005). Recovery of partial 16s rDNA sequences suggests the presence of crenarchaeota in the human digestive ecosystem. *Current Microbiology* 51(5): 317-321.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis.** (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson** (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24: 104-8.
- Sauer, K., U. Harms and R. K. Thauer** (1997). Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri* - purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MT1. *European Journal of Biochemistry* 243(3): 670-677.
- Sauer, K. and R. K. Thauer** (1997). Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri* - zinc dependence and thermodynamics of the methanol:cob(I)alamin methyltransferase reaction. *European Journal of Biochemistry* 249(1): 280-285.
- Sauer, K. and R. K. Thauer** (1998). Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri* - identification of the active-site histidine in the corrinoid-harboring subunit MtaC by site-directed mutagenesis. *European Journal of Biochemistry* 253(3): 698-705.
- Sauer, K. and R. K. Thauer** (1999). Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri* - substitution of the corrinoid harbouring subunit MtaC by free cob(I)alamin. *European Journal of Biochemistry* 261(3): 674-681.
- Sauer, K. and R. K. Thauer** (2000). Methyl-coenzyme M formation in methanogenic archaea - involvement of zinc in coenzyme M activation. *European Journal of Biochemistry* 267(9): 2498-2504.
- Sauer, K. and R. K. Thauer** (1999). The role of corrinoids in methanogenesis. In: *Chemistry and Biochemistry of B<sub>12</sub>* (Banerjee, R., ed.) pp. 655-679. Wiley, New York.

- Siciliano, S. D. and D. R. S. Lean** (2002). Methyltransferase: An enzyme assay for microbial methylmercury formation in acidic soils and sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(6): 1184-1190.
- Slikkerveer, A. and F. A. Dewolff** (1989). Pharmacokinetics and toxicity of bismuth compounds. *Medical Toxicology and Adverse Drug Experience* 4(5): 303-323.
- Sollmann, T. and J. Seifter** (1939). The pharmacology of trimethylbismuth. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 67(1): 17-49.
- Sun, H. Z., L. Zhang and K. Y. Szeto** (2004). Bismuth in medicine. Metal ions in biological systems, Vol 41: Metal Ions And Their Complexes In Medication 41: 333-378.
- Suzuki, H. u. M., Y.** (2001). Organobismuth compounds. Elsevier Science b.V., Amsterdam.
- Tallant, T. C., L. Paul and J. A. Krzycki** (2001). The MtsA subunit of the methylthiol:coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina barkeri* catalyses both half-reactions of corrinoid-dependent dimethylsulfide:coenzyme M methyl transfer. *Journal of Biological Chemistry* 276(6): 4485-4493.
- Thanbichler, M., B. Neuhierl and A. Bock** (1999). S-methylmethionine metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 181(2): 662-665.
- Thayer, J. S.** (1984). Organometallic compounds and living organisms. Academic Press, Inc., Orlando, Florida.
- Thayer, J. S.** (1995). Environmental chemistry of heavy metals: Hydrido and organo compounds. VCH Publisher, Inc. Weinheim.
- Thayer, J. S.** (2002). Biological methylation of less studied elements. *Applied Organometallic Chemistry* 16: 677-691.
- Thein, S. L. and R. B. Wallace** (1986). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. Davis (ed.), Human genetic diseases, a practical approach, IRL Press.
- Thomas, D. J., S. B. Waters and M. Styblo** (2004). Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicology And Applied Pharmacology* 198(3): 319-326.
- Thomas, F.** (2006). Untersuchung zum Einfluss von  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  auf das Transkriptom von *Methanosarcina mazei* Gö1. Diplomarbeit. Fachbereich Geographie und Biologie der Universität Duisburg-Essen, Standort: Essen.
- Tietze, M., A. Beuchle, I. Lamla, N. Orth, M. Dehler, G. Greiner and U. Beifuss** (2003). Redox potentials of methanophenazine and CoB-S-S-CoM, factors involved in electron transport in methanogenic archaea. *Chemical Biochemistry* 4(4): 333-335.
- Van der Maarel, M. J. E. C., M. Jansen and T. A. Hansen** (1995). Methanogenic conversion of 3-S-methylmercaptopropionate to 3-mercaptopropionate. *Applied and Environmental Microbiology* 61(1): 48-51.
- Walther, R., K. Fahlbusch, R. Sievert and G. Gottschalk** (1981). Formation of trideuteromethane from deuterated trimethylamine or methylamine by *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Bacteriology* 148(1): 371-373.
- Wang, X., S. P. Heazlewood, D. O. Krause and T. H. J. Florin** (2003). Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16s rDNA sequence analysis. *Journal of Applied Microbiology* 95(3): 508-520.
- Weast, R. C.** (1988). CRC handbook of chemistry and physics. 69th edition. CRC press, Boca Raton.



- Weimer, P. J. and J. G. Zeikus** (1978). One carbon metabolism in methanogenic bacteria - cellular characterization and growth of *Methanosarcina barkeri*. Archives of Microbiology 119(1): 49-57.
- Westöö, G.** (1966). Determination of methylmercury compounds in foodstuffs. I. Methylmercury compounds in fish, identification and determination. Acta Chemica Scandinavica 20(8):2131-2137.
- Wickenheiser, E. B., K. Michalke, R. Hensel, C. Drescher, A. V. Hirner, B. Brutishauser und R. Bachofen** (1998). Volatile compounds in gases emitted from the wetland bogs near lake cadagno. In: Peduzzi, R., R. Bachofen and M. Tonolla (ed.). Lake cadagno: A meromictic lake. Documenta dell'istituto italiano di idrobiologia, no. 63.
- Wilker, J. J. and S. J. Lippard** (1997). Alkyl transfer to metal thiolates: Kinetics, active species identification, and relevance to the DNA methyl phosphotriester repair center of *Escherichia coli* Ada. Inorganic Chemistry 36(6): 969-978.
- Wood, J. M., A. Cheh, L. J. Dies, W. P. Ridley, S. Rakow and J. R. Lakowicz** (1978). Mechanisms for biomethylation of metals and metalloids. Federation Proceedings 37(1): 16-21.
- Yamada, R. H., S. Shimizu and S. Fukui** (1966). Factors affecting anaerobic photolysis of cobalt-carbon bond of cobalt-methylcobalamin. Biochimica et Biophysica Acta 124(1): 195-197.
- Yamada, R. H., S. Shimizu and S. Fukui** (1966). Preparation of solid vitamin B<sub>12r</sub> by anaerobic photolysis of methylcobalamin. Archives of Biochemistry and Biophysics 117(3): 675-677.
- Zakharyan, R. A. and H. V. Aposhian** (1999). Arsenite methylation by methylvitamin B<sub>12</sub> and glutathione does not require an enzyme. Toxicology and Applied Pharmacology 154(3): 287-291.
- Zakharyan, R. A., A. Sampayo-Reyes, S. M. Healy, G. Tsaprailis, P. G. Board, D. C. Liebler and H. V. Aposhian** (2001). Human monomethylarsonic acid (MMA(v)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. Chemical Research in Toxicology 14(8): 1051-1057.
- Zehnder, A. J. B. and K. Wuhrmann** (1976). Titanium(III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for culture of obligate anaerobes. Science 194(4270): 1165-1166.
- Zhou, Z. H. S., K. Peariso, J. E. Penner-Hahn and R. G. Matthews** (1999). Identification of the zinc ligands in cobalamin-independent methionine synthase (MetE) from *Escherichia coli*. Biochemistry 38(48): 15915-15926.

## 7 Anhang

**Tab. 29** Mittelwert ( $\pm \sigma$ ) der gemessenen Bismutkonzentration [ $\text{nmol g}^{-1}$  TG] der Organe und Blutproben der KONV-, KF- und KONV-Kontroll-Gruppe

<b>Bismutgehalt <math>m \pm \sigma</math> [<math>\text{nmol g}^{-1}</math> TG]</b>								
<b>KONV-Gruppe</b>								
	<b>U-Gr. 1</b>	<b>U-Gr. 2</b>	<b>U-Gr. 3</b>	<b>U-Gr. 4</b>	<b>U-Gr. 5</b>	<b>U-Gr. 6</b>	<b>U-Gr. 7</b>	<b>U-Gr. 8</b>
<b>Leber</b>	1808,81	4533,15	36338,8	16415,1	8661,9	9630,4	12491,7	10069,6
<b>Lunge</b>	3634,8	3730,3	8293,3	8349,9	16031,7	6551,1	10274,2	9946
<b>Nieren</b>	31668,2	38570,8	37817,2	26293,5	35681,2	37450,9	32493,9	35912,7
<b>Hoden</b>	2036,9	6986,5	5642,8	2598,3	3854,5	3413,6	7766,4	5564,3
<b>Hirn</b>	516,1	948,5	20084,7	754,2	699,2	828,4	2376,8	1377,2
<b>Blut</b>	828,8	1537,7	1789,5	1344,5	1504,1	2223,2	3617,3	2749,5
<b>KF-Gruppe</b>								
	<b>U-Gr. 1</b>	<b>U-Gr. 2</b>	<b>U-Gr. 3</b>	<b>U-Gr. 4</b>	<b>U-Gr. 5</b>	<b>U-Gr. 6</b>	<b>U-Gr. 7</b>	
<b>Leber</b>	1012	987,5	1002,6	1659,7	1554,1	1274,6	823,1	
<b>Lunge</b>	1703,3	1083,5	2025,9	2177,1	3898,9	1830,4	1910,4	
<b>Nieren</b>	28452	30273,7	29911,5	26319,7	21174,7	19141,4	17669,5	
<b>Hoden</b>	994,3	1643,9	1402,2	1061,1		1349,4		
<b>Hirn</b>	310,3	301,2	322,9	267,1	385,5	327,2	284,5	
<b>Blut</b>	273,9	177,8	404	95,9	281,6	174,4	108,8	
<b>KONV-Kontroll-Gruppe</b>								
	<b>U-Gr. 1</b>	<b>U-Gr. 2</b>	<b>U-Gr. 3</b>					
<b>Leber</b>	25	81,1	1,7					
<b>Lunge</b>	23	605	204,8					
<b>Nieren</b>	138,1	111,8	130,7					
<b>Hoden</b>		62,1	164,7					
<b>Hirn</b>	13,7	9	32,5					
<b>Blut</b>	17,3	27,9	26,6					

**Tab. 30**  $V_{\max\text{Test}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. MtbA Präp. I von *M. mazei* in Gegenwart / Abwesenheit von CoM im Protein-Vorinkubations-Mix (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 4$ ) bei verschiedenen Konzentrationen der MtbA im Bismut-Methylierungs-Assay

Konzentration MtbA [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] Präparation I	$V_{\max\text{Test}} \pm \sigma$ [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ]	Lag-Phase $V_{\max\text{Test}} \pm \sigma$ [sec]
0,5	DL	
0,5 + CoM	$23,8 \pm 5,4$	$824 \pm 86,3$
1	DL	
1+ CoM	$19,1 \pm 0,4$	$360,5 \pm 0,7$
10	$3,24 \pm 0,2$	$483,5 \pm 31,8$
10+ CoM	$1,1 \pm 0,1$	$71,5 \pm 0,7$
100	$0,3 \pm 0,004$	$190 \pm 8,5$
100+ CoM	$0,02 \pm 0,001$	$40,5 \pm 6,4$

DL = Detektionslimit

**Tab. 31**  $V_{\max\text{Test}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. MtbA Präp. II von *M. mazei* in Gegenwart / Abwesenheit von CoM im Protein-Vorinkubations-Mix (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 4$ ) bei verschiedenen Konzentrationen der MtbA im Bismut-Methylierungs-Assay

Konzentratio n MtbA [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] Präparation II	$V_{\max\text{Test}} \pm \sigma$ [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ]	Lag-Phase $V_{\max\text{Test}} \pm \sigma$ [sec]
0,5	$39,6 \pm 2,3$	$413,5 \pm 113,8$
0,5+ CoM	$45,7 \pm 7,5$	$250,5 \pm 13,4$
1	$25,4 \pm 6,5$	$236,5 \pm 31,8$
1+ CoM	$25,2 \pm 6,5$	$156 \pm 11,3$
10	$0,9 \pm 0,2$	$48,5 \pm 0,7$
10+ CoM	$0,6 \pm 0,01$	$44,5 \pm 2,1$
100	$0,1 \pm 0,001$	$29,5 \pm 2,1$
100+ CoM	$0,03 \pm 0,01$	$35,5 \pm 3,5$

**Tab. 32**  $V_{\max\text{Test}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] der  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion bei verschiedenen Bismutkonzentrationen in Abhängigkeit von der CoM-Konzentration in enzymatischen Bismut-Methylierungs-Assays

	<b>Bi-Ammoniumcitrat-Konzentration im Assay [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b><math>V_{\max\text{Test}} \pm \sigma</math> [<math>\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}</math>]</b>
<b>100 <math>\mu\text{M}</math> CoM</b>	0,5	0
	1	0
	10	0
<b>200 <math>\mu\text{M}</math> CoM</b>	0,5	$0,001 \pm 0,002$
	1	$0,02 \pm 0,03$
	10	0
<b>300 <math>\mu\text{M}</math> CoM</b>	0,5	$0,02 \pm 0,04$
	1	$0,1 \pm 0,14$
	10	$0,0001 \pm 0,0001$
<b>500 <math>\mu\text{M}</math> CoM</b>	0,5	$0,04 \pm 0,003$
	1	$0,16 \pm 0,03$
	10	$1,18 \pm 0,09$

**Tab. 33**  $V_{\max\text{Test}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. MtbA von *M. mazei* in Gegenwart von CoM +/- Bi-Ammoniumcitrat, DTT und GSH; (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 6$ )

<b>Ansatz</b>	<b><math>V_{\max\text{Test}} \pm \sigma</math> [<math>\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}</math>]</b>	<b>Lag-Phase <math>V_{\max\text{Test}} \pm \sigma</math> [sec]</b>
<b>A1 (Kontrolle)</b>	$5,4 \pm 0,8$	$217 \pm 20$
<b>A2</b>	$0,5 \pm 0,06$	$41 \pm 4$
<b>A3</b>	$4,4 \pm 0,1$	$153 \pm 8$
<b>A4</b>	$5,2 \pm 0,2$	$274 \pm 47$
<b>A5</b>	$0,9 \pm 0,2$	$38 \pm 3$
<b>Pr + CoM 1'</b>	$1 \pm 0,07$	$72 \pm 3$
<b>Pr + CoM 10'</b>	$0,8 \pm 0,04$	$48 \pm 0,4$
<b>Pr + CoM 100'</b>	$0,5 \pm 0,04$	$43 \pm 6$
<b>Pr + GSH 100'</b>	$1,6 \pm 0,07$	$130 \pm 22$
<b>DTT</b>	$0,6 \pm 0,02$	$33 \pm 2$
<b>Pr + DTT 100'</b>	$0,9 \pm 0,1$	$33 \pm 3$

**Tab. 34**  $V_{\max\text{Test}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. MtbA von *M. mazei* in Gegenwart von TCEP, TiCit, CoM, Bi-Ammoniumcitrat oder  $\text{ZnSO}_4$ ; (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 4$ )

Ansatz	$V_{\max\text{Test}} \pm \sigma$ [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ]	Lag-Phase $V_{\max\text{Test}} \pm \sigma$ [sec]
<b>A1</b>	$5,4 \pm 0,8$	$217 \pm 20$
<b>A2</b>	$0,5 \pm 0,06$	$41 \pm 4$
<b>Vorinkubation mit TCEP</b>		
Pr+CoM+Bi+TCEP	$1,6 \pm 0,6$	$50 \pm 2$
Pr+CoM+Zn+Bi+TCEP	$0,9 \pm 0,2$	$35 \pm 0,7$
Pr+TCEP	$2,2 \pm 0,4$	$39 \pm 1$
Pr+CoM+Zn+TCEP	$0,3 \pm 0,03$	$40 \pm 4$
Pr+Zn+TCEP	$2 \pm 0,7$	$37 \pm 2$
<b>TCEP-Zugabe zum Start</b>		
Pr+CoM+Bi_!TCEP!	$3,1 \pm 0,9$	$61 \pm 16$
Pr+CoM+Zn_!TCEP!	$4,6 \pm 0,7$	$36 \pm 4$
Pr+Zn_!TCEP!	$5,7 \pm 1,8$	$58 \pm 0,6$
Pr+CoM_!TCEP!	$4,7 \pm 0,07$	$34 \pm 1$
Pr_!TCEP!	$7,9 \pm 0,3$	$185 \pm 8$
<b>TiCit</b>		
Pr_!0.5mMTiCit!	$3,6 \pm 1$	$146 \pm 3$
Pr+0.5mMTiCit	$6,2 \pm 0,7$	$282 \pm 1$
Pr+0.5mMTiCit+Bi150'	$0,6 \pm 0,09$	$63 \pm 0,7$

**Tab. 35**  $V_{\max\text{Test}}$  [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ] und Lag-Phase [sec] der enzymatischen  $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion durch die rek. MtbA von *M. mazei* in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $(\text{CoM})_2$  (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 4$ )

Ansatz	$V_{\max\text{Test}} \pm \sigma$ [ $\text{nmol mg}^{-1} \text{sec}^{-1}$ ]	Lag-Phase $V_{\max\text{Test}} \pm \sigma$ [sec]
<b>A1</b>	$5,4 \pm 0,8$	$217,3 \pm 19,7$
<b>A2</b>	$0,5 \pm 0,06$	$41,4 \pm 3,5$
<b>A3</b>	$4,4 \pm 0,07$	$153 \pm 7,7$
<b>A4</b>	$5,2 \pm 0,2$	$274 \pm 46,6$
<b>A5</b>	$0,9 \pm 0,2$	$37,9 \pm 3,4$
<b>Pr_!(CoM)<sub>2</sub></b>	$7,4 \pm 0,03$	$1851,5 \pm 0,8$
<b>Pr_!H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>!</b>	$8 \pm 1,2$	$718 \pm 8,5$
<b>Pr_!(CoM)<sub>2</sub> + DTT!</b>	$0,8 \pm 0,08$	$293 \pm 0,4$

**Tab. 36**      **Spektrofotometrisch-bestimmte mittlere MeCob- und Cob(I)-Konzentrationen [ $\mu\text{M} \pm \sigma$ ,  $n = 3$ ] in anaeroben in vitro-Assays mit Enzym-Präp. I oder II. Die Assays enthielten  $1500 \mu\text{M}$  CoM und  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  MtbA (Präp. I oder II) in  $50 \text{ mM}$  Hepes und wurden durch Zugabe von MeCob (Endkonzentration  $260 \mu\text{M}$ ) gestartet.**

Reaktionszeit [min]	$m \pm \sigma$ MeCob [ $\mu\text{M}$ ]		$m \pm \sigma$ Cob(I) [ $\mu\text{M}$ ]	
	Präp. I	Präp. II	Präp. I	Präp. II
1	302,6 $\pm$ 64,9	202,3 $\pm$ 7,8	67,12 $\pm$ 16,2	54,9 $\pm$ 0,8
2	298,8 $\pm$ 65,5	142,4 $\pm$ 8,4	66,94 $\pm$ 16,5	84,3 $\pm$ 7,1
3	291,8 $\pm$ 68,7	109,9 $\pm$ 9,1	66,67 $\pm$ 16,3	110,7 $\pm$ 7,1
4	281,9 $\pm$ 70,6	93,3 $\pm$ 7,1	66,68 $\pm$ 15,9	118,9 $\pm$ 0,9
5	270,6 $\pm$ 72,9	85,1 $\pm$ 5,5	69,11 $\pm$ 15	121,3 $\pm$ 2
6	256,5 $\pm$ 73,4	81,1 $\pm$ 4,8	73,03 $\pm$ 16,2	122,6 $\pm$ 5,4
7	243,3 $\pm$ 74,3	78,4 $\pm$ 4,8	78,08 $\pm$ 19,5	125,7 $\pm$ 5,4
8	229,2 $\pm$ 73,9	78,1 $\pm$ 4,8	85,67 $\pm$ 23,5	123,3 $\pm$ 0,1
9	212,9 $\pm$ 69,9	78,1 $\pm$ 4,9	95,04 $\pm$ 25,1	123,5 $\pm$ 2,4
10	196,0 $\pm$ 63,8	78,1 $\pm$ 4,9	106,19 $\pm$ 26,4	123,5 $\pm$ 2,3
11	180,3 $\pm$ 57,8		109,66 $\pm$ 20,5	
12	166,6 $\pm$ 52,5		114,23 $\pm$ 16,4	
13	154,7 $\pm$ 47,6		126,06 $\pm$ 23,2	
14	144,5 $\pm$ 43,5		123,95 $\pm$ 14,1	
15	135,9 $\pm$ 39,7		122,53 $\pm$ 8,5	
16	128,6 $\pm$ 36,7		124,77 $\pm$ 7,2	
17	122,5 $\pm$ 34,1		123,37 $\pm$ 5,5	
18	117,3 $\pm$ 31,9		126,64 $\pm$ 5,8	
19	113,1 $\pm$ 30		124,73 $\pm$ 4,8	

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhard Hensel, im Fachbereich Biologie und Geografie, Abteilung Mikrobiologie der Universität Duisburg-Essen, Campus Essen durchgeführt. Mein Dank gilt folgenden Personen, ohne deren Unterstützung und Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Hensel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, seine wertvolle wissenschaftliche und menschliche Unterstützung und viele nützliche Diskussionen sowie Hinweise,

Prof. Dr. Alfred V. Hirner, Leiter der Abteilung für Umweltanalytik und Geochemie im Fachbereich Chemie der Universität Duisburg-Essen, Campus Essen für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten ICP-MS-Analytik,

Dr. Klaus Michalke für die Betreuung meiner Arbeit während der ersten Jahre wodurch es mir gelungen ist, meine Forschung in die richtigen Bahnen zu lenken sowie für die Ausbildung zur ‚ICP-MS-Technikerin‘,

Dr. Roland Diaz-Bone für die Betreuung meiner Arbeit während der letzten zwei Jahre durch die es mir gelungen ist, die richtigen Schlüsse zu ziehen und den wissenschaftlichen Kreis zu schließen,

Dr. Petra Kirsch, kommissarische Leiterin des Tierforschungszentrums der Universität Ulm für die Durchführung der Fütterungsstudien an den in dieser Arbeit verwendeten keimfreien Mäusen und die hilfsbereite Zusammenarbeit,

Dr. Philip Dammann und TÄ Christine Krüger, Mitarbeiter des zentralen Tierlaboratoriums des Universitätsklinikums Essen, für die Durchführung der Fütterungsstudien an den in dieser Arbeit verwendeten konventionellen Mäusen und die langjährige effektive Zusammenarbeit,

Herrn Roland Fleischer für seine geduldigen Ratschläge und seine stete Hilfsbereitschaft bei der Reparatur des ICP-MS PQ2 sowie Mr. Lee Griffith von der Firma Ionflight, Charlestown, USA, für seine schnelle und unbürokratische Lieferung von Ersatzteilen sowie seinen kostenlosen Email-Support. Ohne diese Hilfen wäre meine Arbeit nicht zu einem baldigen Ende gekommen.



Thomas Knura für die Durchführung der spektrofotometrischen Analysen sowie seine unersätzliche Hilfe bei allen technischen Fragen und Problemen des Laboralltags und die Einweisung in die Geheimnisse der HPLC und Proteinreinigung,

Sabine Effenberger für die besten *Methanosarcina mazei*-Kulturmedien, ihre stete Hilfsbereitschaft und ihren rauen Charme,

Dominik Pieper für die Durchführung der Ethylierungsexperimente und seine Unterstützung bei den Bemühungen, das ICP-MS PQ2 vom Selbstmord abzuhalten,

Oliver Würfel für die Herstellung des Cob(I) und seine chemische und analytische Beratung,

Dr. Andre Plagens für das Zuhören und Beraten bei beruflichen und privaten Sorgen und Freuden, alle geselligen Zigaretten- und Wasserpausen und das Ertragen alberner Spitznamen,

Dr. Britta Tjaden und für ihre stete Bereitschaft als menschliches Lexikon zu fungieren sowie für Spaß und Abwechslung während und nach der Arbeit,

Dr. Melanie Zaparty für Freundschaft, Spaß, Cappuccino und die lustigste Bahnfahrt der Welt,

Frank Thomas für viele wertvolle wissenschaftliche Diskussionen, gute Limericks und gehacktes Rind,

allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern um Prof. Dr. Reinhard Hensel Dr. Hatim Ahmed, Karin Bendt, Beatrix Bialek, Hildegard Eling, Patrick Haferkamp, Anna Hagemann, Dr. Sonja Koning, Theresa Kouril, Dr. Jeannette Marrero, Annika Mathias, Kohei Matsubara, Dr. Jörg Meyer, Kerstin Neuhaus, Annette Schmidt, Veronika Schneider, Bettina Siebers, Andreas Tessarek und Stephanie Vorwerk für die gute Zusammenarbeit, viel Spaß im Labor und oft auch danach,

Markus Adamczak, Mitarbeiter der zentralen Elektronikwerkstatt, Dieter Brym und Udo Behrendt, Mitarbeiter der zentralen Mechnikwerkstatt sowie Raimund Schmidt und Hans-Joachim Barth, Mitarbeiter der Glasbläserei für ihre Hilfsbereitschaft und ihren Erfindungsreichtum bei Reparaturen und technischen Problemen aller Art,

---

allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Umweltanalytik und Geochemie für die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt Dr. Frank Hasenäcker, Jörg Hippler, Markus Hollmann, Maria Madani und David Riesop, die mir stets mit Rat und Tat beigestanden haben,

Tatjana Heinrich für das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit,

meinen Freunden Regina Urban und Peter Schnietz dafür, dass sie immer für mich da waren und an mich geglaubt haben,

meiner besten Freundin Christine Hahnel für ungezählte lustige Abende, ihre Freundschaft und ganz allgemein für ihre Existenz,

meinen Eltern, die mir ermöglicht haben, meinen Weg zu gehen,

Klaus für sein Verständnis und seine Unterstützung in allen Lebenslagen – und überhaupt.

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 11.08.2010

Britta Huber

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Mikrobielle Derivatisierung von Bismut im Maus-Modell und *in vitro*-Analysen der Biogenese von Trimethylbismut“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Britta Huber befürworte.

Essen, 11.08.2010

Prof. Dr. Reinhard Hensel

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät / Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, 11.08.2010

Britta Huber

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name: Britta Huber  
Anschrift: Gemarkenstraße 54  
45147 Essen  
Geburtsdatum: 21. Juni 1977  
Geburtsort: Bochum  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Peter Huber  
Bärbel Huber, geb. Fierbeck

### Schulische und akademische Ausbildung

1983 – 1987 Grundschole Lindenerstraße, Bochum  
1987 – 1996 Hildegardisgymnasium, Bochum  
1996 – 2002 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum  
Abschluss Diplom (18. September 2002)  
Seit Juni 2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Promotionsstudentin  
in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie I, Prof. Dr. R. Hensel,  
Universität Duisburg-Essen, Campus Essen

### Diplomarbeit

Zeitraum: Juni 2001 bis Mai 2002  
Betreuer: Prof. Dr. F. W. Falkenberg  
Thema: „Wirkung von depotgebundenen immunstimulierenden Substanzen  
auf die Immunorgane“

### Promotionsarbeit

Zeitraum: Juli 2005 bis Juni 2010  
Betreuer: Prof. Dr. R. Hensel  
Thema: „Mikrobielle Derivatisierung von Bismut im Maus-Modell und *in vitro*-Analysen der Biogenese von Trimethylbismut“

### Publikationen

Michalke, K., A. Schmidt, B. Huber, J. Meyer, M. Sulkowski, A. V. Hirner, J. Boertz, F. Mosel, P. Dammann, G. Hilken, H. J. Hedrich, M. Dorsch, A. W. Rettenmeier and R. Hensel (2008). Role of Intestinal Microbiota in Transformation of Bismuth and Other Metals and Metalloids into Volatile Methyl and Hydride Derivatives in Humans and Mice. *Applied and Environmental Microbiology* 74(10): 3069-3075.